Mémoire de recherche forestière n° 135

Evaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres

par F. Colas
et S. Mercier

Après avoir obtenu en 1984 un diplôme de technicien en biotechnologie à l'École Nationale de Chimie de Paris, Fabienne COLAS a poursuivi ses études supérieures à l'Université Paris 7 Jussieu où, en 1990, elle a obtenu un Diplôme d'Études Supérieures Spécialisées en génétique et physiologie végétale. Au Québec, elle a travaillé durant cinq saisons comme assistante de recherche à la Direction de la recherche forestière, dans des projets qui portaient sur les semences résineuses et les pollens ; depuis 1998, elle est chargée de recherches : ses projets portent sur la conservation des pollens des arbres forestiers, l'amélioration de la germination des graines résineuses et la lutte contre les agents pathogènes portés par les graines.

Stéphan MERCIER est ingénieur forestier, diplômé de l'Université Laval depuis 1986. En 1988, l'Université d'Angers (France) lui décerne une licence en Physiologie appliquée à la culture des végétaux, et il obtient une maîtrise sur la physiologie des semences forestières à l'Université Laval en 1991. À titre d'assistant de recherches, il a travaillé à l'Université de Joensuu (Finlande) et à l'Institut national de recherches agronomiques d'Orléans (France). Il est depuis 1988 à l'emploi de la Direction de la recherche forestière où, en plus de son rôle de chef d'équipe, il dirige les projets sur l'aménagement des vergers à graines de 2e génération et sur la biologie des graines d'arbres feuillus. En 1989, l'Ordre des ingénieurs forestiers du Québec lui décernait le titre d'*ingénieur forestier de l'année*.

Depuis de nombreuses années, chacun des Mémoires et des autres rapports publiés par la Recherche forestière est révisé par un **comité** *ad hoc* d'au moins trois membres recrutés aussi bien à l'intérieur du Ministère que dans le milieu universitaire, la fonction publique du Canada ou les autres milieux de la recherche. Les responsables de la Recherche forestière remercient les scientifiques qui ont accepté bénévolement de revoir le texte présenté ici et de participer ainsi à la diffusion des résultats des recherches menées au ministère des Ressources naturelles du Québec.

Les publications de la Recherche forestière sont produites et diffusées à même les budgets de recherche et de développement, comme autant d'étapes essentielles à la réalisation de chaque projet ou expérience. En conséquence, ces documents sont, par définition, à *tirage limité* et à *diffusion restreinte*. Adresser toute demande à :

Publications
Direction de la recherche forestière
Forêt Québec, MRN
2700, rue Einstein
SAINTE-FOY (Québec)
Canada G1P 3W8

Courriel : rech.for@mrn.gouv.qc.ca

100-04822/

Évaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres

Dédicace

Nous dédions ce travail à la mémoire de Mme Marie-Thérèse Cerceau-Larrival (1930-1998), qui fut directrice de recherche au CNRS et responsable du Laboratoire de Palynologie du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris de 1968 à 1996. Elle fut l'une des premières à créer, dès 1984, une banque de pollen dans le but de conserver le patrimoine génétique des espèces végétales menacées.

Nous avons pu bénéficier de ses précieux conseils lors de l'établissement de nos protocoles de recherche sur la mise au point des tests de germination ainsi que la mise en conservation à long terme des pollens.

Évaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres

par

Fabienne Colas, biologiste, D.E.S.S.

et

Stéphan Mercier, ing.f., M.Sc.

Service de la génétique, de la reproduction et de l'écologie

Mémoire de recherche forestière n° 135

Gouvernement du Québec
Ministère des Ressources naturelles
Forêt Québec
Direction de la recherche forestière
2000

Ce texte constitue le rapport partiel du projet de recherche n° 3420-0205-212S :
« Biologie et conservation du pollen d'arbres forestiers ».

2000-3041

ISBN 2-550-35041-3
Dépôt légal 2000
Bibliothèque nationale du Québec
Bibliothèque nationale du Canada
© 2000 Gouvernement du Québec

Avertissement

Les termes suivis d'un astérisque (*) sont définis dans un glossaire qui se trouve à la fin du document (p. 57).

Remerciements

De nombreuses personnes ont contribué à l'établissement de la banque de pollen depuis 1988. Les auteurs tiennent d'abord à remercier M. Carol Parent et Mme Linda Veilleux, du Service de la génétique, de la reproduction et de l'écologie du ministère des Ressources naturelles, qui ont assuré la gestion de la banque et qui ont réalisé les tests de germination *in vitro* du pollen.

Nous aimerions par la même occasion souligner le travail de Mme Pauline Bertrand du Centre d'expérimentation et de greffage de Duchesnay, de Mme Heidi Wyse et de M. Alain Légaré du Service de la génétique, de la reproduction et de l'écologie, pour leur aide lors de la réalisation des expériences, et de Mme Marie-Ève Caissy pour la révision de la revue bibliographique. De plus, nous aimerions souligner l'appui financier de la Direction de la production de semences et de plants (DPSP) de Forêt Québec, ministère des Ressources naturelles.

La révision de ce manuscrit a été réalisée par M. Michel Villeneuve (DRF), M. Luc Masse (DPSP), M. Gaétan Daoust (CFL) et M. Fabien Caron (DRF). Nous avons apprécié leurs commentaires constructifs.

Résumé

La Direction de la recherche forestière du ministère des Ressources naturelles a créé en 1988 une banque de pollen* pour maintenir en tout temps des réserves de pollen viable. Cette banque est mise à la disposition des responsables du Programme d'amélioration génétique des arbres et des responsables de vergers à graines qui désirent effectuer des travaux de pollinisation de masse et de croisements dirigés* dans le but de produire des graines améliorées destinées à la Bouturathèque située à la Pépinière forestière de Saint-Modeste. La production de pollen varie selon les années. Ainsi, lors des années de faible production, le programme de croisements pourra se poursuivre grâce à l'utilisation du pollen conservé dans cette banque, dont la particularité est la quantité massive de pollen qu'elle contient, ce qui contraste avec la plupart des autres banques de pollen dont le rôle est la conservation des espèces. En 1998, cette banque comportait plus de 22 litres de pollen représentant plus de 17 espèces d'arbres forestiers. Ce mémoire propose tout d'abord une revue de littérature sur l'évaluation de la viabilité* et le rôle de la teneur en eau sur la qualité* du pollen et sur la conservation du pollen. Puis il présente les différentes étapes nécessaires à la mise en place d'une banque de ce genre, du traitement du pollen jusqu'à sa conservation à long terme, en passant par les techniques qui servent à évaluer la qualité du pollen qui entre ou sort de la banque.

Mots-clés : pollen, conservation, banque, test de germination*, test de viabilité*, teneur en eau, gestion.

Abstract

Evaluating and maintaining the viability of pollens used in the tree improvement program. *In 1988, a pollen bank was created by the* Direction de la recherche forestière *of Québec's* Ministère des Ressources naturelles *(*MRN*) with the aim of accumulating viable pollen reserves. This bank was made available to researchers working on the program for the genetic improvement of trees, and to those in charge of producing improved seeds for the* Bouturathèque *at the Saint-Modeste forest nursery (Québec). Pollen production is cyclic. Therefore, during years of poor production, the bank enables the breeding program to continue its work using conserved pollen. The main feature of the* MRN *pollen bank is the great quantities of pollen that are kept in it. This differs greatly from other known pollen banks whose main role is species conservation. In 1998, it contained more than 22 litres of pollen representing more than 17 forest tree species. This report begins with a review of the available literature on the determination of viability and the important role of water content on pollen quality and conservation. It then presents the different steps for the development of such a bank, from pollen treatment to long term conservation. The techniques used to evaluate the quality of pollen are also described.*

Key words : pollen, conservation, bank, germination test, viability test, water content, management.

Table des matières

Avertissement v

Remerciements v

Résumé vi

Abstract vi

Liste des tableaux xiii

Liste des figures xv

Introduction générale 1

Première partie — Revue de littérature 3

Chapitre premier

Évaluation de la viabilité du pollen 5

1.1 Évaluation de la viabilité du pollen à l'aide de tests colorimétriques 5

1.1.1 Réactions basées sur la présence de molécules spécifiques dans le grain de pollen 5

1.1.2 Réactions dues à une activité physiologique 6

1.1.2.1 Réactions utilisant les sels de tétrazolium 6

1.1.2.2 Test au diacétate de fluorescéine (FCR) 6

1.1.2.3 Comparaison de différents tests colorimétriques 7

1.1.3 Conclusion 7

1.2 Évaluation de la viabilité du pollen à l'aide de tests physiologiques rapides 8

1.2.1 Dosage de l'ATP intracellulaire 8

1.2.2 Dosage des glucides endogènes 8

1.2.3 Mesure de la conductivité 8

1.2.4 Mesure de la respiration 8

1.2.5 Spectroscopie à infrarouge 9

1.2.6 Conclusion 9

1.3 Évaluation de la viabilité du pollen à l'aide d'un test de germination *in vitro* 9
1.3.1 Mécanismes de la germination pollinique 10
1.3.1.1 Facteurs influençant la viabilité du pollen 10
1.3.1.2 Élongation du tube pollinique 12
1.3.2 Notion de vigueur du pollen 12
1.3.3 Composition du milieu de germination 13
1.3.3.1 Rôle des ions 13
1.3.3.2 Rôle des sucres 13
1.3.3.3 Autres composants du milieu 15
1.3.3.4 pH du milieu de culture 15
1.3.4 Nature du milieu 15
1.3.5 Conditions culturales 16
1.3.5.1 Température 16
1.3.5.2 Éclairage 16
1.3.6 Limites du test de germination *in vitro* 16
1.4 Évaluation de la viabilité du pollen par un test de germination *in vivo* (ou test de fécondité) 18
1.5 Corrélations entre les différentes techniques servant à évaluer la viabilité du pollen 18
1.5.1 Comparaison des tests de germination *in vitro* et des tests colorimétriques 18
1.5.2 Comparaison de germination *in vitro* et des tests biochimiques 19
1.5.3 Comparaison des pourcentages de germination et de fécondité 19

Chapitre deux

Influence de la teneur en eau sur la viabilité et la conservation du pollen 21
2.1 Teneur en eau du pollen 21
2.2 Maintien de la teneur en eau initiale du pollen au cours de sa conservation 22
2.3 Réhydratation du pollen 22

Chapitre trois

Conservation du pollen 25
3.1 Effet de la conservation sur la qualité du pollen 25
3.2 Facteurs influençant la conservation 27
3.2.1 Humidité relative de l'air ambiant 27
3.2.2 Température de conservation 27
3.2.3 Composition de l'atmosphère pendant la conservation 28
3.2.4 Type de pollen 28
3.3 Les différentes techniques de conservation 29
3.3.1 La lyophilisation 29
3.3.2 Conservation dans des solvants organiques 29
3.3.3 Conservation dans l'huile 29

Deuxième partie — Gestion de la banque de pollen 31

Chapitre premier

Rôles d'une banque de pollen 33

Chapitre deux

Conservation du pollen 35

2.1 Processus de conservation des pollens d'arbres résineux 35
2.1.1 Récolte des inflorescences mâles 35
2.1.2 Premier séchage 35
2.1.3 Tamisage 37
2.1.4 Conservation à court terme 37
2.1.5 Second séchage 41
2.1.6 Test de germination et test de viabilité 41
2.1.7 Mesure de la teneur en eau 41
2.1.8 Lyophilisation et conservation à long terme 43
2.1.9 Prélèvement de pollen 43
2.2 Processus de conservation des pollens d'arbres feuillus 43
2.2.1 Récolte des inflorescences mâles 43
2.2.2 Séchage et extraction 43
2.2.3 Conservation à court terme 45
2.2.4 Conservation à long terme 45
2.2.5 Test de germination et mesure de la teneur en eau 45

Chapitre trois

Viabilité du pollen 49

3.1 Tests de germination (milieu solide) 49
3.1.1 Acclimatation 49
3.1.2 Réhydratation 49
3.1.3 Milieu de culture 50
3.1.4 Détermination du pourcentage de germination 53
3.2 Tests de viabilité (milieu liquide) 53

Conclusion générale 55

Glossaire 57

Références 61

Annexe I. Informations utiles pour acquérir les principales pièces d'équipement nécessaire aux différentes étapes de conservation et d'évaluation de la viabilité du pollen 71

Annexe II. *Vade mecum* de la gestion de la banque de pollen du ministère des Ressources naturelles du Québec 73

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition par espèce du nombre et de la superficie des vergers à graines de 1re génération implantés au Québec 2

Tableau 2. Colorants spécifiques de molécules présentes dans les grains de pollen, utilisés pour des tests colorimétriques 6

Tableau 3. Colorations spécifiques d'activités physiologiques ayant lieu dans les grains de pollen 7

Tableau 4. Évolution du pH d'une solution de saccharose à 10 %, de pH initial variable, durant 24 h d'incubation pour le test de germination *in vitro* du pollen de *Picea pungens* 16

Tableau 5. Différentes techniques de conservation de quelques pollens d'arbres forestiers 17

Tableau 6. Différentes techniques de conservation de quelques pollens d'arbres forestiers 28

Tableau 7. Gabarit des tamis servant à l'extraction du pollen pour les principales espèces utilisées dans le Programme d'amélioration génétique des arbres 37

Tableau 8. Description des milieux de culture nécessaires à la germination *in vitro* du pollen pour chaque espèce utilisée dans le Programme d'amélioration génétique des arbres 50

Tableau 9. Composition du réactif d'Alexander servant à la coloration des grains de pollen 53

Tableau 10. Table de Stanley et Linskens indiquant la taille de l'échantillon à dénombrer pour obtenir un pourcentage de germination du pollen qui soit statistiquement valable avec un seuil de 5 % 53

Liste des figures

Figure 1. Mécanismes biochimiques en cause lors de l'allongement du tube pollinique 14

Figure 2. Les différentes parties d'un grain de pollen d'arbre résineux (à l'exception du mélèze et du douglas taxifolié) 26

Figure 3. Différents rôles d'une banque de pollen 34

Figure 4. Processus de conservation à court et à long terme du pollen des arbres résineux 36

Figure 5. Cônes mâles d'épinette blanche 38

Figure 6. Inflorescences mâles déhiscentes de bouleau jaune 38

Figure 7. Séchoir à convection utilisé lors du premier séchage des cônes mâles 39

Figure 8. Séchage des cônes mâles préalable au tamisage du pollen 39

Figure 9. Étapes nécessaires au tamisage du pollen 40

Figure 10. Flacon de type pénicilline de 10 ml utilisé pour la conservation à long terme du pollen 42

Figure 11. Différents types de bouchon en caoutchouc utilisés pour fermer hermétiquement les flacons de type pénicilline 42

Figure 12. Flacons fermés à l'aide de bouchons transpercés par une aiguille afin de permettre l'échappement des gaz 42

Figure 13. Contenant utilisé lors du second séchage du pollen 42

Figure 14. Contenant utilisé lors du second séchage du pollen 44

Figure 15. Lyophilisateur permettant de sécher à froid les échantillons de pollen destinés à la conservation à long terme 45

Figure 16. Lyophilisation du pollen 46

Figure 17. Entrée des échantillons dans la banque de pollen 47

Figure 18. Processus de conservation à court et à long terme du pollen des arbres feuillus 48

Figure 19. Stérilisation en autoclave des milieux de culture et des instruments servant à l'ensemencement des boîtes de Pétri 51

Figure 20. Boîte de Pétri contenant un milieu de culture gélosé ensemencé avec un échantillon de pollen 52

Figure 21. Grains de pollen d'épinette de Norvège avec leur tube pollinique 52

Figure 22. Technique de la goutte pendante 54

Figure 23. Feuille à remplir lors de la récolte de lots de pollen devant être entreposés dans la banque 76

Figure 24. Exemple de fiche présentant la répartition des bouteilles de pollen dans le tiroir 27 de la banque de pollen 77

Figure 25. Feuille de prélèvement de lots de pollen entreposés dans la banque 78

Introduction générale

Le Programme d'amélioration génétique des arbres a débuté au Québec en 1969 afin de répondre aux besoins du reboisement. La gestion des forêts est sous la juridiction du Québec et le ministère des Ressources naturelles (MRN) s'engage à fournir gratuitement les plants destinés au reboisement afin de permettre la remise en production des forêts publiques et privées. Cet objectif de reboisement est actuellement de l'ordre de 150 millions de plants par année.

Toutefois, il ne suffit pas de planter un nombre élevé d'arbres pour obtenir une forêt de qualité. L'aménagement adéquat de la ressource forestière est l'un des points majeurs qui assure cette qualité. Il est également possible d'améliorer la qualité de cette ressource en augmentant la qualité génétique des arbres de reboisement. C'est sur ce dernier principe que furent établis les 83 vergers à graines de première génération destinés à produire les semences génétiquement améliorées. Ces vergers à graines couvrent une superficie totale de 1 084 hectares (Lamontagne 1992).

Au total, douze espèces sont représentées dans ces vergers à graines, dont les principales sont l'épinette noire et le pin gris (tableau 1). Chacun de ces vergers a été planifié pour répondre aux besoins du reboisement d'un territoire bien défini. Les premiers ont déjà commencé à produire en 1988 et l'on prévoit qu'il sera possible de combler les besoins en graines génétiquement améliorées vers l'an 2000 (Rainville et Lamontagne 1991).

Parallèlement à l'établissement de ces vergers à graines, des tests de descendances et des travaux de croisements dirigés sont en cours afin d'augmenter les gains génétiques, ainsi que l'amorce des vergers à graines de deuxième génération issus des greffes d'arbres sélectionnés lors de la première génération pour produire les semences désirées (Mercier et Patry 1994).

La réalisation du Programme d'amélioration génétique demande donc une très grande quantité de pollen. Plusieurs litres de pollen sont récoltés chaque année. Ces volumes sont énormes si on considère que la plupart des banques de pollen conservent quelques centaines de millilitres tout au plus (CERCEAU-LARRIVAL 1987, JÖRGENSEN 1990, CALLEN et CERCEAU 1992). C'est pour cette raison que la banque de pollen des arbres forestiers a été créée en 1988 par le Service de la génétique, de la reproduction et de l'écologie du ministère des Ressources naturelles afin de maintenir d'importantes réserves de pollen d'une année à l'autre. Cette banque est actuellement située à Québec dans les locaux de la Direction de la recherche forestière, Forêt Québec, ministère des Ressources naturelles.

Cette banque permet de réaliser chaque année des travaux de croisements dirigés sans se soucier du niveau de production de pollen qui est très irrégulier d'une année à l'autre. De plus, le délai qui s'écoule entre la dissémination* du pollen et la réceptivité* des fleurs femelles est souvent trop court pour qu'on puisse récolter les inflorescences mâles, extraire le pollen, évaluer sa viabilité et polliniser au cours d'une même saison. Il est également fréquent que les dates de dissémination des fleurs mâles ne coïncident pas avec celles de la réceptivité des fleurs femelles. Ces phénomènes de protogynie* et de protandrie* empêchent donc la pollinisation naturelle. On peut cependant les contrer en réalisant les croisements avec du pollen conservé.

Tableau 1. Répartition, par espèce, du nombre de sources améliorées implantées au Québec (tiré de LAMONTAGNE 1992 et DESHAIES 1999, communication personnelle)

Espèce	Vergers à graines*	Tests de descendances*	Tests de provenances*	Parcs à clones*	Total
Bouleau jaune	1				1
Chêne rouge	2				2
Douglas taxifolié	1				1
Épinette blanche	19		2	2	23
Épinette de Norvège	4		4	1	9
Épinette noire	21	14			35
Épinette rouge	3				3
Frêne d'Amérique	1				1
Mélèze d'Europe	3		8		11
Mélèze du Japon	1		2		3
Mélèze hybride	7		13		20
Mélèze laricin	4	1	6		11
Noyer noir	2				2
Pin blanc	6			1	7
Pin gris	11	6			17
Pin rouge	1				1
Pin sylvestre	1		6		7
Total	**88**	**21**	**41**	**4**	**154**

Première partie

Revue de littérature

Chapitre premier

Évaluation de la viabilité du pollen

Les responsables du Programme d'amélioration génétique des arbres forestiers ont besoin de pollen de haute qualité pour maximiser la production de graines. Le moyen le plus fiable pour évaluer la qualité du pollen est de dénombrer les graines issues de croisements. Toutefois, ce processus est long et coûteux. De plus, le phénomène d'incompatibilité peut fausser les résultats.

La germination *in vitro* permet d'évaluer la capacité germinative du pollen dans des conditions définies et adaptées aux espèces étudiées. Toutefois, cette seconde méthode peut surestimer l'aptitude réelle du pollen à germer dans des conditions naturelles. Deux autres méthodes peuvent servir à évaluer la viabilité du pollen ; il s'agit de tests physiologiques, permettant de doser des molécules nécessaires à l'activité physiologique future du grain de pollen, et de tests colorimétriques, qui évaluent la qualité du pollen. Ces deux types de test présentent l'avantage d'être rapides et économiques bien que les résultats qu'ils produisent surestiment encore davantage la viabilité réelle de l'échantillon testé.

Cette revue de littérature fait donc le point sur les différentes techniques utilisées pour évaluer et maintenir la viabilité des pollens. Dans ce premier chapitre, nous décrivons les différentes méthodes utilisées ainsi que leurs limites et les facteurs qui influencent la qualité du test.

1.1 Évaluation de la viabilité du pollen à l'aide de tests colorimétriques

Il existe deux types de tests colorimétriques. Le premier produit une réaction avec des molécules spécifiques alors que le second est lié à une activité physiologique particulière.

1.1.1 Réactions basées sur la présence de molécules spécifiques dans le grain de pollen

Ces tests sont basés sur la propriété qu'ont certains colorants de réagir en présence de molécules organiques. La concentration de ces molécules déterminera l'intensité de la coloration qui indiquera l'état de maturation du grain de pollen (Stanley et Linskens 1974).

L'isatine est un colorant spécifique de la proline (Palfi et Gulyas 1985), acide aminé présent en grande quantité dans les grains de pollen, jusqu'à 200 mM chez le *Petunia* (Hong-Qi *et al*. 1982). Elle est utilisée à la fois comme substrat énergétique et comme source d'acides aminés pour la synthèse protéique (Hong-Qi *et al*. 1982). La concentration de proline augmente au cours de la maturation du grain de pollen ; la coloration traduit donc l'état de la maturité* de celui-ci). Käpylä (1991) a utilisé l'isatine dans une étude sur le vieillissement pour indiquer la viabilité du pollen du bouleau. Le traitement de vieillissement appliqué au pollen a entraîné une réduction très importante de sa viabilité *in vitro*, alors que tous les grains apparaissaient colorés et donc viables. Cette expérience illustre bien les limites des tests de coloration qui surestiment la viabilité réelle des échantillons testés. Dans la même étude, Käpylä (1991) a testé d'autres colorants, comme le carmin acétique qui révèle la présence du matériel génétique, et l'iodure de potassium qui colore l'amidon (Stanley et Linskens 1974), substance de réserve utilisée dans les premières réactions de la germination. Dans ces deux cas, la coloration est identique chez les grains morts et chez les grains vivants, ce qui rend les résultats peu fiables. Ainsi, la présence de molécules organiques importantes dans les grains de pollen,

bien qu'indiquant la maturité du grain, n'est pas forcément un bon indicateur de viabilité. Les résultats ainsi obtenus surestiment la viabilité des échantillons (JANSSEN et HERMSEN 1976, KLAEHN et NEU 1960). Ces tests rapides sont préférables aux autres méthodes d'évaluation de la viabilité lorsqu'un résultat approximatif est suffisant (TOWILL 1985). Le tableau 2 récapitule les colorations les plus couramment utilisées.

Un autre type de coloration peut être envisagé. Il ne se base pas sur une activité métabolique particulière mais repose sur la présence du cytoplasme dans la cellule végétative. Le colorant d'ALEXANDER (1969) permet d'identifier les grains de pollen qui possèdent leur cytoplasme. OWCZARZAK (1952) a mis au point une coloration fondée sur le même principe que celle d'Alexander ; les grains dits « fonctionnels » ont leur cytoplasme coloré en rose et leur paroi en vert ; les grains avortés apparaissent verts. Cependant, la présence d'un cytoplasme n'assure pas pour autant la viabilité du grain de pollen (CERCEAU-LARRIVAL et CHALLE 1986). Cette coloration est surtout utilisée pour identifier des individus présentant une stérilité mâle.

1.1.2 Réactions dues à une activité physiologique

1.1.2.1 Réactions utilisant les sels de tétrazolium

Les sels de tétrazolium permettent d'évaluer des activités enzymatiques comme les déshydrogénases et les péroxydases. La réaction doit avoir lieu à l'obscurité et durant un temps défini pour chaque espèce (SHIVANNA et JOHRI 1985). Le réactif, incolore, est réduit en un complexe coloré par la respiration cellulaire. Si le colorant est en contact au-delà du temps nécessaire, la coloration ne sera plus spécifique mais sera due à l'oxygène de l'air. Les sels de tétrazolium les plus couramment utilisés sont le chlorure de 2,3,5 triphényle tétrazolium (TTC ; SMITH 1951, COOK et STANLEY 1960, RAJORA et ZSUFFA 1985, SHIVANNA et JOHRI 1985) et le nitrobleu tétrazolium (NBT ; HAUSER et MORRISON 1964, KÄPYLÄ 1991).

Un des problèmes posés par l'utilisation de ces colorants est d'établir la corrélation entre l'intensité de la coloration du pollen et le pourcentage de viabilité qui lui est associé. En effet, si la majorité des grains présente une coloration intracellulaire uniforme traduisant la viabilité ou la non-viabilité, d'autres se situent dans les couleurs moyennes. Il devient alors difficile de les classer dans une catégorie définie (SHIVANNA et JOHRI 1985, VERGANO *et al.* 1990). Toutefois, les tests utilisant les sels de tétrazolium ont été jugés fiables pour le pollen de pin (COOK et STANLEY 1960) et de peuplier (RAJORA et ZSUFFA 1985).

1.1.2.2 Test au diacétate de fluorescéine (FCR)

Cette technique a été mise au point en raison du manque de fiabilité des tests colorimétriques comme ceux qui utilisent les sels de tétrazolium. HESLOP-HARRISON et HESLOP-HARRISON (1970) ont énoncé que (nous traduisons) :

> *« [...] un facteur fortement lié à la viabilité de la cellule du gamétophyte mâle (le grain de pollen) est l'état du plasmalemme*. S'il montre une perméabilité normale, la cellule doit être viable ».*

Tableau 2. Colorants spécifiques de molécules présentes dans les grains de pollen, utilisés pour des tests colorimétriques

Colorant	Molécule cible	Couleur produite	Référence
Isatine	Proline	N.S.[1]	PALFI et GULYAS 1985 KÄPYLÄ 1991
Carmin acétique	ADN et ARN	Rouge carmin	STANLEY et LINSKENS 1974
Iodure de potassium	Amidon	Bleu foncé	STANLEY et LINSKENS 1974 OLENSEN et WARNCKE 1989
Bleu aniline	Callose	Fluorescent jaune vert	MARTIN 1959
Colorant d'Alexander[2]	N.S.[1]	Cytoplasme en rose paroi en vert	OWCZARZAK 1952 ALEXANDER 1969

[1] N.S. : non spécifié dans l'article.
[2] Description faite dans le tableau 9.

Ces chercheurs ont mis au point le test au diacétate de fluorescéine (FCR) qui est largement utilisé (STANLEY et LINSKENS 1974, SHIVANNA et JOHRI 1985, VERGANO *et al.* 1990, KÂPYLÂ 1991). Ce test est basé sur l'hydrolyse du diacétate de fluorescéine par les estérases cellulaires. Le diacétate de fluorescéine est un ester de fluorescéine qui est non fluorescent et non polaire et qui pénètre donc facilement les membranes organiques. L'hydrolyse entraîne la production de fluorescéine libre qui traverse mal les membranes intactes et qui s'accumule donc dans la cellule où elle peut être détectée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Il est également possible de doser la fluorescéine à l'aide d'un spectrophotomètre combiné à un filtre ultra-violet).

Ce test, appliqué au pollen, permet de déterminer deux propriétés de la cellule végétative : la présence et l'activité de l'enzyme réalisant le clivage du diacétate de fluorescéine (estérase) ainsi que l'existence d'un plasmalemme intact capable de retenir la fluorescéine (SHIVANNA et HESLOP-HARRISON 1981). Ce test n'est pas en mesure d'évaluer le pouvoir fécondant du pollen mais il donne une bonne indication de sa viabilité.

Comme pour les autres tests colorimétriques, le test au FCR présente des limites de fiabilité. En effet, l'exine* des grains de pollen contient des pigments de type caroténoïde et flavonoïde. La présence de doubles liaisons dans leur structure peut entraîner une fluorescence non représentative. Par rapport au nombre d'espèces où le test au FCR a été jugé fiable, le nombre de cas présentant un pollen autofluorescent est faible (SORENSSON *et al.* 1989). Selon KÂPYLÂ (1991), on doit proscrire la technique qui utilise le diacétate de fluorescéine lorsque la lecture se prolonge puisqu'il y a atténuation de la fluorescence et augmentation du bruit de fond qui rendent les résultats difficilement analysables. De plus, il faut noter que les coûts liés à cette technique sont relativement élevés eu égard à l'achat des équipements nécessaires à l'observation.

Le tableau 3 récapitule les différentes colorations utilisées pour révéler une activité cellulaire du grain de pollen.

1.1.2.3 Comparaison de différents tests colorimétriques

ALAMI *et al.* (1988) ont réalisé une étude des effets du froid sur la viabilité du pollen de sorgho. Ces auteurs ont utilisé quatre tests cytochimiques pour évaluer la viabilité de leurs échantillons. Les résultats sont très variables d'un test à l'autre. Pour leur part, BINDER *et al.* (1974) ont analysé différentes méthodes de coloration et ont conclu que ces techniques ne sont pas satisfaisantes pour déterminer la viabilité du pollen. En fait, ces colorations dépendent non seulement de la viabilité, mais aussi de la température, de la durée d'exposition et de l'espèce. De plus, les résultats ne sont pas seulement exprimés en termes de vivant ou de mort. Une gamme intermédiaire peut représenter différents degrés de vigueur* et de dégénérescence. Ainsi, lors d'une expérience, il est préférable de réaliser plusieurs colorations plutôt qu'une seule afin d'obtenir un résultat plus fiable.

1.1.3 Conclusion

La réalisation de tests colorimétriques (ou cytochimiques) pour évaluer la viabilité de lots de pollen permet d'obtenir rapidement des résultats. Ces méthodes sont précises pour identifier les grains de pollen dépourvus de cytoplasme ou sans contenu enzymatique, qui sont incapables de germer. Cependant, étant donné la présence de grains ne pouvant être rangés dans les catégories vivant ou mort du fait de leur coloration intermédiaire, d'autres tests ont été mis au point afin d'augmenter la fiabilité des résultats.

Tableau 3. Colorations spécifiques d'activités physiologiques ayant lieu dans les grains de pollen

Colorant	Activité enzymatique révélée	Couleur produite	Référence
TTC	Déshydrogénase, péroxydase, réductase	Rouge	COOK et STANLEY 1960
Nitrobleu tétrazolium	Déshydrogénase	Bleu	HAUSER et MORRISON 1964
Diacétate de fluorescéine	Estérase cellulaire	Fluorescent jaune	HESLOP-HARRISON 1970

1.2 Évaluation de la viabilité du pollen à l'aide de tests physiologiques rapides

La section précédente montre que les tests colorimétriques utilisés pour prédire la viabilité des échantillons de pollen peuvent donner des résultats dont la fiabilité est parfois douteuse. D'autres tests ont été mis au point afin d'améliorer cette fiabilité. Il s'agit soit de dosages de molécules vitales comme l'adénosine triphosphate (ATP) et les glucides endogènes (Ching *et al.* 1975, Stanley et Poostchi 1961), soit de mesures traduisant l'intégrité cellulaire (Ching et Ching 1976), soit de la mesure de la respiration des échantillons de pollen (Binder et Ballantyne 1975). Le test par spectroscopie à infrarouge peut également illustrer les changements biochimiques dans les grains de pollen durant leur germination (Sowa et Conner 1995).

1.2.1 Dosage de l'ATP intracellulaire

L'ATP est la source d'énergie du métabolisme cellulaire. La teneur en ATP révèle la charge énergétique de la cellule et, par conséquent, son potentiel à réaliser des réactions biochimiques vitales. Le dosage de l'ATP a été mis au point sur des pollens de conifères comme les sapins, le douglas et la pruche (Ching *et al.* 1975). Par cette étude, les auteurs ont démontré le lien qui existait entre la teneur cellulaire en ATP et la capacité des grains de pollen à germer. L'avantage de ce test réside dans sa rapidité et dans sa facilité d'exécution. Cependant, il présente l'inconvénient d'être relativement coûteux.

1.2.2 Dosage des glucides endogènes

La teneur en glucides du pollen est un indicateur de la viabilité potentielle d'un échantillon (Stanley et Poostchi 1961). Les glucides contenus dans le pollen sont extraits à l'aide d'une solution d'éthanol à 70 %. Ce dosage est une méthode longue, qui exige beaucoup de matériel (200 mg, ce qui peut être limitant pour les échantillons de faible volume).

Ching et Ching (1976) ont mis au point un test rapide basé sur la teneur en glucides du filtrat d'un échantillon de pollen (voir section 1.2.3). Les glucides libérés par les cellules sont dosés par la méthode utilisant le réactif d'anthrone (Veilleux *et al.* 1992). La teneur en glucides du filtrat est inversement proportionnelle au pourcentage de germination du pollen.

1.2.3 Mesure de la conductivité

Ching et Ching (1976) ont développé une technique qui consiste à mesurer la conductivité d'un filtrat de pollen. Ce filtrat est obtenu à mesure que le grain de pollen vieillit après son immersion dans un volume donné d'eau désionisée durant une période déterminée. La conductivité observée est la conséquence de la libération de substances ionisées dans le milieu réactionnel. Une conductivité élevée traduit une sortie massive de composés de la cellule. Ce lessivage est attribué à une mauvaise qualité des membranes cellulaires incapables de retenir les métabolites cellulaires. Comme pour le test FCR, cette piètre qualité illustre l'incapacité du grain de pollen à germer dans les conditions naturelles.

Les auteurs préconisent d'utiliser une quantité de pollen de 30 mg pour 10 ml d'eau (Ching et Ching 1976, Philippe *et al.* 1991), ce qui peut être limitant pour les échantillons de faible volume. Philippe *et al.* (1991) font subir au pollen de mélèze une réhydratation de 16 heures en germoir avant d'effectuer la mesure. Sur les pollens étudiés par Ching et Ching (1976) — de douglas taxifolié, de sapin noble et de pruche occidentale — aucun traitement préalable n'est appliqué. C'est justement le manque d'une réhydratation préalable qui a été évoqué comme cause principale de la mauvaise corrélation qu'on observe souvent entre la conductivité et la fertilité*. Webber (1996) affirme qu'en hydratant le pollen du douglas avant de procéder au test de conductivité, le lessivage du pollen est réduit et la corrélation entre la production de graines pleines et la réaction au test est augmentée. La mesure de la conductivité est simple d'exécution et donne des résultats rapides. C'est pourquoi elle a été retenue par plusieurs auteurs pour évaluer la viabilité du pollen notamment au cours de la conservation des échantillons (Foster et Bridgwater 1979, Webber 1987, Philippe *et al.* 1991, Webber et Bonnet-Masimbert 1993).

1.2.4 Mesure de la respiration

Certains auteurs ont démontré la relation qui existait entre la respiration des grains de pollen et leur pouvoir de fécondation (Binder et Ballantyne 1975, Webber et Bonnet-Masimbert 1989). Ainsi, la mesure de la respiration permet de connaître la quantité d'oxygène consommé par un échantillon de pollen. Le taux de respiration illustre le métabolisme oxydatif qui se produit dans la cellule ; plus celui-ci est élevé, plus la cellule est active et plus elle est considérée comme apte à la germination. Par opposition à la mesure de la conductivité d'un filtrat de pollen, l'évaluation de la consommation d'oxygène est plus complexe à réaliser couramment (Webber 1987). En effet, ce test demande beaucoup d'équipements techniques et n'est donc pas recommandé de façon opérationnelle (Webber 1996). Par contre, cette mesure est un très bon indice de la germination *in*

vivo du pollen (Moody et Jett 1990). Pour Webber (1996), ce serait le meilleur indice de la fertilité du pollen en raison de son insensibilité au niveau initial d'hydratation.

1.2.5 Spectroscopie à infrarouge

Le problème majeur que posent la plupart des techniques usuelles permettant d'évaluer la viabilité du pollen est leur nature destructive. Ce problème est contourné par la spectroscopie à infrarouge. En effet, Sowa et Connor (1995) utilisent la technique du *FTIR* (*Fourier transform infrared spectroscopy*) pour examiner le métabolisme et les changements structuraux de grains de pollen intacts durant leur germination. Il est possible de corréler les pics et les dépressions de la courbe résultante des informations recueillies par la spectroscopie à infrarouge avec différentes étapes de la germination des grains de pollen. On observe plusieurs changements comme l'augmentation des activités respiratoires, des changements dans la phase et la quantité des lipides dans la membrane, des modifications dans la quantité de protéines de même que dans leur structure secondaire et dans la formation de la paroi cellulaire. Cette technique utilisant une faible quantité de pollen donne un aperçu biochimique du processus de germination des grains. Elle permet également le développement d'une analyse plus détaillée de la viabilité et de la vigueur du pollen.

1.2.6 Conclusion

L'intérêt porté aux tests rapides pour évaluer la viabilité du pollen est dû à la lenteur à obtenir des résultats par les tests de germination *in vitro* et surtout *in vivo*. Towill (1985) souligne toutefois que ces tests rapides nécessitent une quantité appréciable de pollen pour leur réalisation. À titre d'exemple, il faut 30 mg de pollen pour mesurer la conductivité (Ching et Ching 1976) et de 10 à 100 mg pour doser l'ATP (Ching *et al.* 1975). Ainsi, ces tests ne peuvent être utilisés que sur des quantités importantes de pollen, quantités qui ne sont pas toujours disponibles notamment dans le cas de travaux de croisements dirigés.

1.3 Évaluation de la viabilité du pollen à l'aide d'un test de germination *in vitro*

Les tests de germination *in vitro* donnent assez rapidement une bonne évaluation de la qualité des échantillons de pollen (Moody et Jett 1990). Les avantages en sont multiples :

— ces tests n'exigent qu'une très faible quantité de pollen (moins de 0,1 ml) ;

— les résultats s'obtiennent assez rapidement, de quelques heures pour le pollen des arbres feuillus à quelques jours pour le pollen des arbres résineux ;

— les résultats obtenus sont reproductibles ;

— à la différence des tests cytochimiques, la germination *in vitro* fait appel à la capacité du pollen à émettre un tube pollinique*, mécanisme qui est celui qui se produit dans la nature lors d'un croisement. Ainsi, l'information fournie est-elle plus rigoureuse.

De nombreuses équipes de recherche s'intéressent à la germination *in vitro* du pollen car les généticiens réclament du pollen de bonne qualité (Cram et Lindquist 1984, Luza et Polito 1985, Verdeil et Pannetier 1990, Webber et Bonnet-Masimbert 1993). Parallèlement aux travaux de croisements dirigés, la germination *in vitro* du pollen d'arbres résineux trouve de nouvelles applications, par exemple pour étudier les effets des pluies acides et de la pollution atmosphérique sur la reproduction des arbres forestiers (Cox 1988, Cela Renzoni et Viegi 1991).

La germination du pollen fait appel à une série de réactions biochimiques qui se traduisent par l'émission et l'allongement d'un tube pollinique. Cependant quelques espèces ne produisent pas de tube pollinique (comme le mélèze et le douglas) ; il s'agit simplement d'un allongement de la cellule. Une des données qui conditionnent le résultat est l'état physiologique dans lequel se trouvent les grains de pollen au moment de la réalisation du test. Les différences dans la composition des milieux de culture ont des effets sur la germination du pollen pour le douglas (Webber et Bonnet-Masimbert 1993), le mélèze *Larix occidentalis* Nutt. (Weber et Ross 1995) et le pin sylvestre (Bonnet-Masimbert et Webber 1995). En effet, le test de germination *in vitro* est le test le plus sensible aux conditions mêmes du test (Webber 1995). Tous les événements intervenant entre la récolte et le test lui-même peuvent également en influencer le résultat, par exemple les conditions de température et d'humidité relative dans lesquelles sont placés les échantillons (Stanley et Linskens 1974, Colas 1992). À cela s'ajoutent d'autres facteurs comme le stress, la pollution, le génotype, etc. (Won Lee *et al.* 1985).

1.3.1 Mécanismes de la germination pollinique

La presente section a pour objet de décrire les mécanismes physiologiques de la germination du pollen. Par la suite, les sections suivantes décriront les composantes du milieu ainsi que les conditions culturales utilisées pour provoquer le développement du tube pollinique *in vitro*.

1.3.1.1 Facteurs qui influençent la viabilité du pollen

Ces facteurs sont multiples. Ils dépendent aussi bien des conditions climatiques lors de la récolte, de l'âge de l'arbre, du type de pollen, de ses conditions d'extraction et de conservation (teneur en eau, température, présence d'oxygène), de la ré-acclimatation préalable au test, de la présence de lumière, des changements brusques dans les conditions environnementales et du niveau de pollution des sites de récolte.

— La date et les conditions au moment de la récolte

Le stade de développement physiologique du pollen au moment de la récolte est un facteur déterminant de sa viabilité. Un pollen récolté trop tôt n'aura pas le temps d'accumuler des réserves d'amidon et de sucres solubles en quantité suffisante pour maintenir sa viabilité. Colas (1992) montre que le pourcentage de germination *in vitro* du pollen de mélèze augmente avec l'avancement de sa maturation pour atteindre une valeur optimale lors de la déhiscence* des cônes mâles. D'autres auteurs mentionnent que la qualité du pollen est meilleure si la récolte des fleurs mâles est réalisée le plus près possible de la date de déhiscence naturelle des cônes mâles (Denison et Franklin 1975, Ho et Copis 1988). Helmer *et al.* (1962) indiquent également que le pollen atteint sa qualité maximale lors de la maturité physiologique, c'est-à-dire lors de la déhiscence naturelle des cônes. La qualité diminue à partir de ce moment.

Les conditions météorologiques lors de la récolte des cônes mâles jouent également sur la qualité du pollen produit. Récolter des cônes mâles sous la pluie augmente substantiellement la teneur en eau des microspores (Copis 1990). Il est par la suite difficile d'abaisser celle-ci sous un seuil satisfaisant pour maintenir la viabilité. Généralement, les grains trop humides ont tendance à être lessivés de leurs constituants solubles (Dowding 1987) ou à entamer hâtivement leur processus de germination. Par ailleurs, les averses ont tendance à projeter au sol le contenu en pollen des cônes mâles qui sont déhiscents (Mercier *et al.* 1994). De même, le moment de la récolte est de première importance. En effet, chez le jojoba (*Simmondsia chinensis* Mill.), plus le délai entre le début de la floraison et la récolte est important, moins le pollen est viable (Won Lee *et al.* 1985). Le moment de la journée où est faite la récolte est aussi un facteur à ne pas négliger. Ce moment le plus propice est la fin de la matinée alors que l'air est sec mais la température pas trop élevée (Shivanna et Johri 1985 ; Cerceau-Larrival, communication personnelle).

— L'âge de l'arbre

Au cours de la croissance d'un arbre, des mutations ou des délétions d'allèles vont s'accumuler avec le temps (Ledig 1986, Klekowski 1988). Aizen et Rovere (1995) ont montré qu'il existe une relation entre l'âge de l'arbre et la viabilité du pollen qu'il produit. En effet, le taux d'avortement du pollen augmente progressivement avec l'âge de l'arbre. Ceci est toutefois compensé par le fait que les arbres âgés produisent beaucoup plus de pollen que les jeunes individus.

— Le type de pollen

Il existe deux catégories de pollen dans le monde végétal : ceux de type bicellulaire, qui comportent deux noyaux à l'intérieur du gamète au moment de leur dissémination, et ceux de type tricellulaire qui ont trois noyaux (Hoekstra et Bruinsma 1980, Bajaj 1987, Cerceau-Larrival et Challe 1986, Cauneau-Pigot 1988). Les microspores tricellulaires sont plus sensibles à la dessiccation puisque leur paroi externe (l'exine) est moins épaisse que celle des microspores bicellulaires (Bajaj 1987). Cet auteur recommande de maintenir la teneur en eau des microspores tricellulaires élevée de manière à ne pas endommager l'exine. La durée de vie de ce dernier type de pollen en sera raccourcie d'autant.

Les pollens tricellulaires sont les plus évolués au niveau phylogénétique*. Lors de la déhiscence*, ils contiennent des mitochondries complètement développées et ils sont capables de germer très rapidement (Hoekstra et Bruinsma 1978, Hoekstra 1979). Au contraire, les pollens bicellulaires ont un développement mitochondrial variable, ce qui entraîne des délais dans l'émergence du tube pollinique (Hoekstra et Bruinsma 1978, Hoekstra 1979). Les pollens des arbres forestiers sont de type bicellulaire.

— Extraction du pollen

Ce potentiel de germination dépend aussi des conditions et de la rapidité avec lesquelles se déroule l'extraction. Après la récolte, le pollen doit être extrait des cônes mâles le plus tôt possible. Toutefois, pour différentes raisons, ceci peut être difficile. Webber (1996) affirme qu'il est possible de conserver les cônes mâles du douglas de 8 à 10 jours à 4 °C sans affecter leur rentabilité ou leur viabilité. Mentionnons que les cônes doivent par contre être conservés dans des sacs en papier et non en plastique.

Au moment de l'extraction, les cônes mâles doivent être exposés idéalement à une température de 30-32 °C dans une atmosphère sèche (Denison et Franklin 1975). Webber (1996) recommande quant à lui une exposition des cônes mâles à des températures de 25 à 30 °C dans une atmosphère d'une humidité relative de moins de 40 %. Si le pollen n'est pas extrait rapidement, la faible quantité de réserves contenues dans chaque grain sera vite utilisée, la respiration en sera altérée et le pollen sera tué rapidement (Snyder et Clausen 1974).

— Teneur en eau du grain de pollen

La teneur en eau du pollen est un facteur prépondérant lorsqu'on désire évaluer la viabilité d'un échantillon, la seconde étant inversement proportionnelle à la première. On a démontré qu'il était primordial de maintenir une faible teneur en eau lors de l'extraction et pendant la conservation du pollen pour obtenir des pourcentages élevés de germination (Lanner 1962, Mellerowicz et Bonnet-Masimbert 1986, Copes 1987). Pour être bien conservé, le pollen doit être déshydraté pour atteindre une teneur en eau voisine ou en-dessous de 10 % (Bonnet-Masimbert et Webber 1995, Mercier 1996, Webber 1996). L'importance de ce facteur prend également toute sa place dans la conservation. Pour ces raisons, l'influence de la teneur en eau sur l'évaluation et le maintien de la viabilité du pollen est traitée séparément à la section 2.1.

— La température de conservation

Nous verrons à la section 3.0 l'importance qu'a la température sur la viabilité du pollen durant sa conservation à court et à long terme.

— La présence d'oxygène

La présence d'oxygène dans le contenant de conservation peut provoquer à long terme une oxydation des métabolites essentiels et ainsi réduire la capacité germinative du pollen. Cet effet est accéléré chez un pollen dont la teneur en eau est plus élevée (Webber 1996). Certains auteurs préconisent de remplacer l'air des flacons par un gaz inerte comme l'azote (Webber 1987). Toutefois, la technique habituellement utilisée consiste à réaliser un vide d'environ 80 à 100 mm de Hg à l'intérieur des flacons (Cerceau-Larrival et Challe 1986). Cette technique présente l'avantage d'être beaucoup moins onéreuse que l'utilisation de l'azote. Il est important de souligner que la réalisation de ce vide doit se faire progressivement et ne doit pas être inférieur à 5 µm de Hg (Cerceau-Larrival 1992). En ce sens, Davies et Dickinson (1971) ont démontré qu'un vide trop poussé diminuait la viabilité du pollen en altérant la respiration et la perméabilité de la membrane cytoplasmique. Nous élaborons davantage sur cette dernière technique dans le chapitre trois qui porte sur la conservation du pollen.

— La lumière

La lumière est un autre facteur qui peut influencer la viabilité du pollen car la présence d'ultraviolets en réduit la viabilité (Pfahler 1973, Flint et Caldwell 1984). Le pollen des espèces anémophiles* a une meilleure résistance à la lumière que celui des espèces entomophiles* (Asbeck 1954). Toutefois, lors du séchage et pendant la conservation, il est préférable de réduire la quantité de lumière reçue afin de préserver la viabilité. Les études portant sur cet aspect sont peu nombreuses. Il est cependant admis que les tests de germination *in vitro* doivent se dérouler à l'obscurité (tableau 5).

— Changement brusque des conditions environnementales

Bajaj (1987) mentionne que les grains de pollen sont très sensibles aux changements brusques des conditions dans lesquelles ils sont placés. Que ce soit pour la température, la teneur en eau, la pression osmotique ou la pression interne (lorsqu'on réalise le vide). Il est donc nécessaire d'acclimater progressivement les lots à de nouvelles conditions environnementales.

— La pollution

Récemment, plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'impact de la pollution atmosphérique sur la qualité du pollen. En effet, l'air est le vecteur pollinisateur chez les espèces anémophiles. Une étude menée en Slovaquie a montré que le pourcentage de germination de pollens provenant d'une localité modérément polluée était réduit de 20 % et jusqu'à 76 % et 84 % dans des habitats hautement pollués (Kormutak *et al.* 1992). De même,

les pollens de bouleau récoltés dans une zone d'activités industrielles avaient les plus mauvais pourcentages de germination (Bocquel 1994, communication personnelle).

Le formaldéhyde (HCHO) est le composé carbonyle le plus abondant dans l'atmosphère (Shirazi et Muir 1998). Dans le *smog*, on le retrouve à une concentration pouvant atteindre 479 mmol m^{-3} dans les alentours de Los Angeles (Shirazi et Muir 1998). Une étude *in vitro* entreprise par Shirazi et Muir (1998) a démontré que le pollen ayant été exposé à différentes concentrations de formaldéhyde pour une durée de 25 heures présentait un pourcentage de germination réduit de 20 à 40 % comparativement au pourcentage de germination observé chez le témoin.

Une étude entreprise par Hughes et Cox (1993), voulait déterminer si le niveau élevé d'acidité contenu dans le brouillard, se présentant fréquemment près de la Baie de Fundy, pouvait avoir des effets néfastes sur la germination du pollen des arbres présents à cet endroit (*Betula papyrifera* et *Betula cordifolia*). Des expériences *in vitro* ont démontré de façon significative l'effet négatif du pH acide sur la germination du pollen de ces espèces, pour différentes températures d'incubation. De plus, on a observé que *Betula cordifolia* a une meilleure tolérance à l'acidité que *Betula papyrifera*.

1.3.1.2 Élongation du tube pollinique

Picton et Steer (1982) donnent une définition du tube pollinique (nous traduisons) :

> *« [...] un tube pollinique en croissance est une cellule unique, enfermant les cellules spermatogènes*, qui s'étend vers les tissus reproducteurs femelle par la croissance de son extrémité, pouvant former une structure ayant plusieurs millimètres de long ».*

C'est l'intine*, membrane interne du grain de pollen, qui donne naissance au tube pollinique. La croissance du tube pollinique se fait, en partie, grâce à l'addition de fragments de membrane à l'extrémité du tube en croissance. Cependant, cette fusion n'est pas suffisante pour qu'on observe la progression du tube. Le réseau de microfilaments qui assurent la rigidité du tube pollinique doit être suffisamment détendu pour que la pression osmotique interne du tube permette l'allongement. Les deux facteurs qui interviennent dans l'allongement du tube pollinique sont influencés par la concentration du milieu en ions calcium (Ca^{2+}), qui doit être comprise entre 10^{-5} et 10^{-2} M (Picton et Steer 1983).

1.3.2 Notion de vigueur* du pollen

L'évaluation du nombre de grains germés parmi la population totale détermine le pourcentage de germination d'un échantillon donné. En ce sens, il est primordial d'établir des critères précis pour considérer un grain comme germé. Pourtant, ces critères varient d'un auteur à l'autre. Ching et Ching (1964) estiment qu'il suffit que la longueur du tube pollinique soit supérieure ou égale au diamètre du grain. Pour Pfeiffer (1955), la longueur du tube doit être supérieure à trois fois le diamètre du grain. Pour Christiansen (1969), seuls les grains de pollen qui développent des tubes polliniques où on peut observer la présence des cellules reproductrices sont considérés comme germés.

Différentes définitions de la vigueur ont été énoncées. Pour la plupart des auteurs, la vigueur correspond au temps nécessaire au tube pollinique pour atteindre le noyau femelle et réaliser la fécondation (Moody et Jett 1990, Shivanna *et al.* 1991). La vigueur du pollen correspond donc au temps nécessaire pour observer le pourcentage maximal de germination. Pour ce faire, on évalue dans un temps donné la vigueur du pollen à la longueur de son tube pollinique émis lors d'une germination *in vitro* (Shivanna et Cresti 1989). Par rapport à la vitesse de germination du pollen du bouleau — le pourcentage maximum est atteint en dix heures environ (Colas et Mercier 1994a) — le pollen des conifères se caractérise par une croissance lente du tube pollinique. Pour expliquer ce phénomène, Cela Renzoni *et al.* (1990) invoquent le décalage important qui existe, *in vivo*, entre la pollinisation et la fécondation de ces espèces. La vigueur diminue plus significativement que la viabilité au cours de la conservation du pollen (Jain et Shivanna 1989, Shivanna *et al.* 1991). Ainsi, un pollen présentant une perte de vigueur sera moins compétitif au moment de la pollinisation (Jain et Shivanna 1990). Avec le développement des banques de pollen, il sera important de considérer la vigueur du pollen conservé en plus de sa viabilité. Les conditions de conservation devront être optimisées pour maintenir à la fois la viabilité et la vigueur (Shivanna *et al.* 1991). Le test de germination *in vitro* peut servir à évaluer la vigueur du pollen à la condition que le pourcentage de germination soit mesuré dans le temps et comparé aux réactions du pollen frais (Shivanna *et al.* 1991).

1.3.3 Composition du milieu de germination

Brewbaker et Kwack (1963) ont établi que les besoins physiologiques pour le développement du tube pollinique sont en général assez faibles. Les milieux les plus simples contiennent du saccharose, du calcium et du bore, dont les concentrations varieront selon les besoins nutritifs du pollen testé. De plus, d'autres composés pourront être ajoutés. La composition exacte du milieu de germination est spécifique à quasiment chaque espèce végétale. Nous examinons ci-dessous le rôle des différents composants des milieux de culture (ions et sucres) ainsi que l'influence de son pH.

1.3.3.1 Rôle des ions

— Le calcium

Le calcium a un rôle prépondérant dans les mécanismes qui interviennent lors de l'élongation du tube pollinique que ce soit lors de l'addition de fragments de membrane à l'extrémité du tube en croissance ou dans le maintien de la souplesse de réseau de microfilaments qui permettent la progression du tube pollinique (Picton et Steer 1983).

— Le bore

On connaît depuis longtemps le rôle important tenu par le bore dans le métabolisme des végétaux ainsi que dans le maintien de l'intégrité des membranes (Marsh et Shive 1941). Visser (1955) a observé que l'addition d'une faible quantité de bore au milieu de culture améliore fortement la germination et la croissance du tube pollinique. En fait, l'allongement du tube pollinique est provoqué principalement par la présence du bore (figure 1 ; Sidhu et Malik 1985). Ces derniers auteurs et Lewis (1987) précisent que cet élément joue un rôle dans :

— la régulation de la croissance et de la différenciation ;

— la régulation de la perméabilité de la membrane cellulaire ;

— l'absorption et la translocation des sucres solubles ;

— la régulation des enzymes du métabolisme des glucides, des polyphénols, des auxines et de la biosynthèse des acides nucléiques.

La germination du pollen de pin peut avoir lieu en l'absence de bore mais en sa présence, la capacité du pollen à métaboliser le glucose augmente à 60 % (Stanley 1971). Une carence en bore provoque un ralentissement du métabolisme et une altération de la structure des membranes qui peuvent aboutir à l'éclatement des grains (Pilbeam et Kirkby 1983, Shivanna et Johri 1985, Vasil 1987) et provoquer une baisse de la masse fraîche du pollen et de sa teneur en eau (Sidhu et Malik 1985). L'acide borique et le borax (tétraborate de sodium) sont les formes de bore le plus souvent utilisées dans les milieux de culture.

— Autres ions

Les cations comme le potassium, le sodium et le magnésium ne sont pas indispensables à la croissance du tube, mais leur présence amplifie l'action du calcium lorsqu'il leur est associé (Brewbaker et Kwack 1963). C'est pourquoi on les retrouve dans la composition des deux principaux milieux de culture du pollen (Brewbaker et Kwack 1963, Heslop-Harrison 1979a).

1.3.3.2 Rôle des sucres

La présence de glucides dans le milieu de culture du pollen favorise la croissance du tube pollinique. Le saccharose est le plus utilisé (Stanley et Linskens 1974, Vasil 1987). Son rôle est double puisqu'il est un agent osmorégulateur et un nutriment carboné qui alimente le métabolisme du grain de pollen lors de la germination (O'Kelley 1955, Nygaard 1977, Sareen et Vasisht 1983, Vasil 1987).

Visser (1955) suggère que « la croissance du tube pollinique n'est réalisée qu'à partir des réserves du grain et que l'effet des sucres sur la germination est, selon toute probabilité, dû à ses propriétés osmotiques ». Ainsi, cet auteur limite le rôle des glucides à celui d'agents régulant les flux d'eau dans le grain de pollen au cours de sa germination. Depuis, plusieurs auteurs ont effectué des recherches afin de caractériser le rôle des glucides lors de la germination. Les grains de pollen des Gymnospermes ont, en général, de faibles réserves glucidiques. Par exemple, le pollen de *Pinus thunbergii* ne contient que 2,8 % d'amidon (Stanley et Linskens 1974). O'Kelley (1955) a utilisé, dans un milieu de culture, des sucres marqués au ^{14}C pour démontrer que les sucres du milieu sont utilisés par le tube pollinique en croissance. Par ailleurs, on a étudié le rôle du saccharose comme agent osmotique avec du pollen de noix de cajou (Subbaiah 1984). Ce pollen germe bien dans une solution contenant 35 % de saccharose. Le pourcentage de germination de ce même pollen n'a présenté aucune différence significative en présence d'une solution, de même pression osmotique, contenant un mélange de saccharose et de polyéthylène glycol (PEG) 4000, agent osmotique inerte qui n'a aucun pouvoir nutritif. De plus, la présence du PEG augmente la vitesse d'apparition du tube pollinique. Chez le douglas

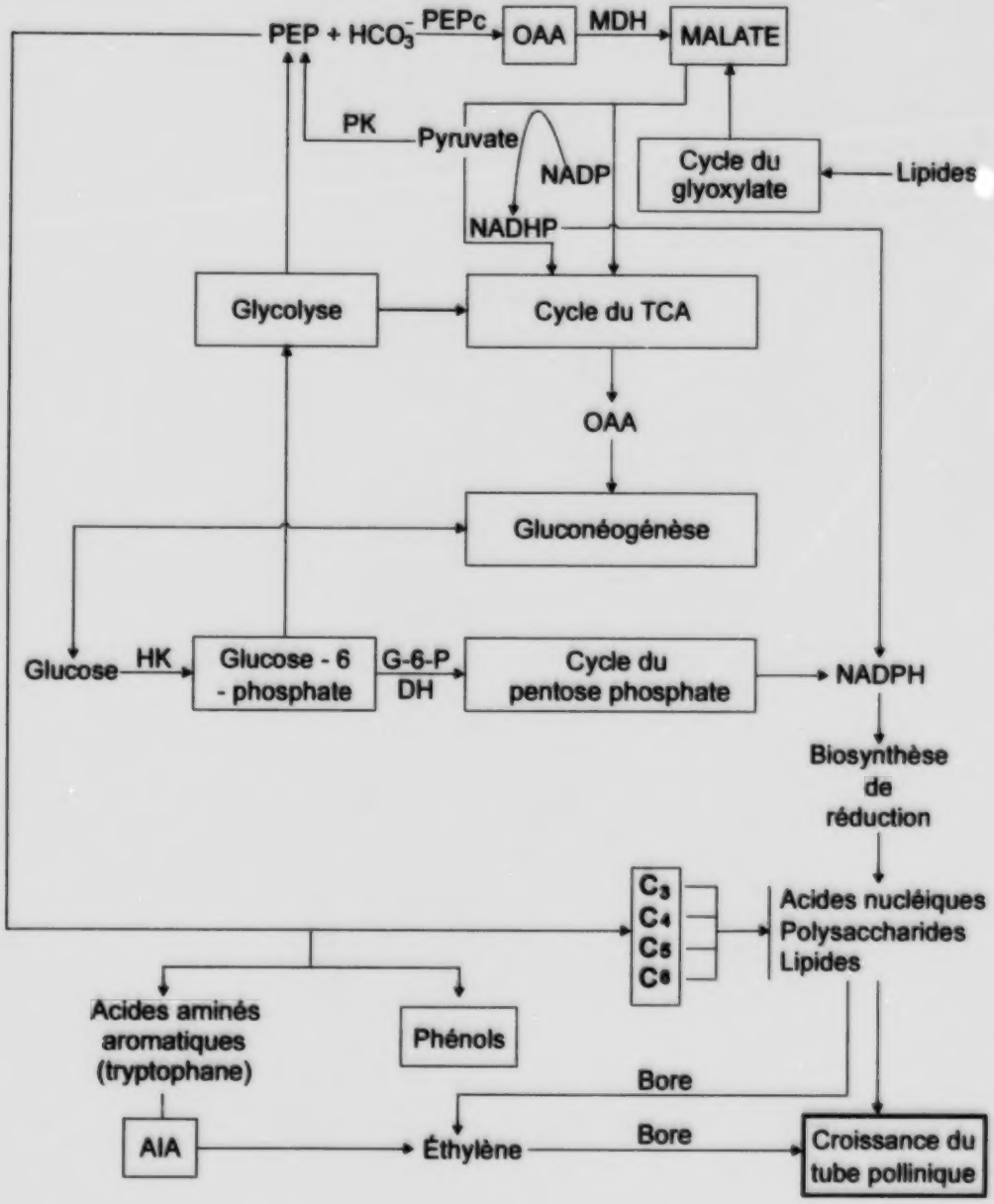

Figure 1. Mécanismes biochimiques en cause lors de l'allongement du tube pollinique.

taxifolié, le saccharose ne semble pas avoir un rôle de source de carbone mais d'agent créant la pression osmotique du milieu de culture (Webber et Bonnet-Masimbert 1993). Pour la même espèce, le milieu de Brewbaker et Kwack (1963), qui ne contient que du PEG, donne d'excellents pourcentages de germination. Toutes ces expériences montrent que les glucides ont bien un double rôle dans les milieux de germination. Toutefois, il apparaît que leur rôle d'agent osmotique soit prédominant dans bien des cas. Un déséquilibre osmotique peut se traduire par une fuite du cytoplasme à l'extrémité du tube, ou par une absence de tube pollinique.

1.3.3.3 Autres composants du milieu

Les pollens ont des vitesses de germination très variables. Par exemple, le pourcentage de germination du pollen d'avocat est évalué après trois heures de culture (Sahar et Spiegel-Roy 1984). Le pollen du bouleau germe facilement en 5 heures (Colas et Mercier 1994a) et celui du douglas commence à germer au bout de 24 heures (Charpentier et Bonnet-Masimbert 1983). La prolongation des cultures peut entraîner l'apparition de contaminants (champignons, bactéries, etc.) et ce malgré l'utilisation de milieux stériles. On a donc envisagé d'additionner des antibiotiques aux milieux de culture. Chez le douglas, l'addition de 15 µg/ml de nystatine et de 15 µg/ml de chloramphénicol empêche la prolifération des bactéries et des champignons tout en n'influençant pas le pourcentage de germination du pollen (Mellerowicz et Bonnet-Masimbert 1983). L'addition de tétracycline au milieu de culture du pollen d'olivier a un effet significatif direct sur la stimulation de la croissance des tubes polliniques. De plus, elle permet la formation de tubes plus longs (Pinney et Polito 1990).

Brewbaker et Kwack (1963) ont étudié l'effet de l'addition de différentes hormones végétales, de vitamines ou d'acides aminés au milieu de germination. Aucun effet de stimulation n'a été mis en évidence. Ceci doit être dû au fait que les grains de pollen contiennent déjà ces composés et n'exigent pas d'excédents pour la croissance du tube pollinique (Stanley et Linskens 1974).

1.3.3.4 pH du milieu de culture

Les deux principaux milieux de culture, ceux de Brewbaker et Kwack (1963) et de Heslop-Harrison (1979a), ont des pH respectifs de 5,3 et 5,8. La plupart des tests de germination ont lieu à des pH voisins de 6 (Shivanna et Johri 1985). Charpentier et Bonnet-Masimbert (1983) ont montré que chez le douglas, les meilleurs pourcentages de germination sont obtenus avec des pH compris entre 4,3 et 6,1. Mellerowicz et Bonnet-Masimbert (1983) ont réalisé une étude semblable sur le pollen de mélèze. Les pH testés initialement se situaient entre 4,0 et 8,2. À la fin de la culture, quel que soit le pH initial, tous les milieux de culture avaient un pH de 6,5 et ce, sans modification significative du pourcentage de germination. Ceci révèle la capacité du pollen à exercer un pouvoir tampon afin de rendre le milieu de culture favorable au développement de leur tube pollinique. La modification du pH débute dès l'immersion du pollen dans la solution et dure toute la culture. Cette propriété a aussi été observée chez deux espèces de pin, le pin pignon et le pin maritime (Cela Renzoni et Viegi 1991) ainsi que chez l'épinette du Colorado (tableau 4 ; Cram et Lindquist 1984). Ces études montrent que le strict maintien du pH du milieu de culture n'est pas indispensable dans la mesure où le grain de pollen est capable de régir le pH de son propre environnement. Van Ryn *et al.* (1986) ont étudié la capacité du pollen de différentes espèces feuillues (comme les bouleaux et les érables) à ajuster le milieu de culture selon son pH initial. Ils ont constaté que le pouvoir tampon du pollen augmente avec la quantité de grains en culture. Toutefois, si le pH est inférieur à 3,4, la germination *in vitro* est bloquée. Ce type de résultat a aussi été observé par Hughes et Cox (1993). Il semble que le pollen des arbres résineux soit moins sensible à ces variations de pH que le pollen des arbres feuillus (Cox 1988).

1.3.4 Nature du milieu

Les techniques les plus utilisées pour réaliser les tests de germination *in vitro* sont la culture en goutte pendante (Righter 1939) et la culture en milieu gélosé (Duffield et Snow 1941).

La culture en goutte pendante présente l'avantage d'utiliser de très faibles quantités de milieu de culture (environ 0,1 ml) et, de ce fait, peu de pollen (Kearns et Inouye 1993). Ce type de culture permet de suivre la croissance du tube pollinique en continu en plaçant la lame directement sous l'objectif d'un microscope. Le principal inconvénient de cette technique est l'instabilité de la goutte qui rend impossible son transport.

La culture sur un milieu gélosé exige plus de matériel, aussi bien du milieu de culture que de pollen. Il est aussi possible d'observer la croissance en continu. Le milieu de culture est stable et il est aisé de le transporter pour effectuer les observations (Kearns et Inouye 1993).

Un des facteurs qui influençent la germination du pollen est la vitesse avec laquelle l'eau est prélevée dans le milieu de culture par le grain (Visser 1955, Heslop-Harrison 1979b). Un moyen de régir cette absorption de l'eau consiste à ajouter de l'agar (agent gélifiant) dans le milieu. Pour le test du pollen de noyer, la solidification du milieu à l'aide d'agar réduit le nombre d'éclatements des grains et améliore à la fois la germination et la longueur des tubes émis. La teneur la plus favorable est de 0,65 % ; à une concentration plus élevée, le pourcentage de germination sera plus faible (Luza et Polito 1985).

1.3.5 Conditions culturales

1.3.5.1 Température

Les tests de germination *in vitro* ont lieu à une température voisine de 25 °C (Klaehn et Neu 1960, Stanley et Linskens 1974, Shivanna et Johri 1985).

Le pollen d'avocat a été testé à différentes températures (Sahar et Spiegel-Roy 1984) ; il en ressort que sa croissance optimale se situe entre 6 et 25 °C ; au-delà de 27 °C, le pourcentage de germination diminue significativement. On peut faire une observation semblable à propos du pollen d'olivier (Fernandez-Escobar *et al.* 1983) ; au-delà de 25 °C, qui correspond à la température pour laquelle on observe le meilleur pourcentage de germination, celui-ci est significativement réduit pour devenir nul à 35 °C. Dans le cas des deux espèces testées, bien que les pourcentages de germination de différentes variétés soient variables, le comportement face à la température demeure le même.

La réalisation de tests de germination du pollen *in vitro* à différentes températures, peut être un moyen de repérer des individus qui tolèrent des températures extrêmes (Egea *et al.* 1992). De plus, elle peut servir à établir des gammes de viabilité servant à faire le lien entre les valeurs obtenues par les tests rapides et celles des tests de germination *in vitro* (Philippe *et al.* 1991, Colas et Mercier 1994b). Chez le pin gris, l'application d'une température de 40 °C pendant 24 heures n'entraîne aucune réduction significative du pourcentage de germination *in vitro* (Colas 1992). En fait, ce n'est qu'à partir de 50 °C qu'on observe une réduction de ce pourcentage. Il faut appliquer une température de 65 °C durant 7 heures pour tuer le pollen de pin gris. Cette baisse est très rapide à 73 °C puisqu'une heure est suffisante pour obtenir un pourcentage nul de germination *in vitro* (Colas et Mercier 1994b). Le pollen des bouleaux n'offre quasiment aucune résistance à la température. En effet, les échantillons soumis à une température de 25 °C durant 3 heures ont une viabilité nulle (Colas et Mercier 1994a).

1.3.5.2 Éclairage

Les tests de germination *in vitro* ont généralement lieu dans l'obscurité (Shivanna et Johri 1985). Brink (1924) et Johnson (1943) ont montré que la lumière n'avait pas d'effet stimulant sur le développement du tube pollinique. Des études plus récentes montrent que la longueur d'onde de la lumière peut avoir des effets stimulants ou inhibiteurs sur la croissance du tube (Chhabra et Malik 1978). Cet effet semble varier fortement selon les espèces (Seema et Rajeev 1982).

Le tableau 5 dresse la liste des références portant sur les différents milieux de culture utilisés pour la germination *in vitro* des pollens d'arbres forestiers.

1.3.6 Limites du test de germination *in vitro*

Brewbaker et Kwack (1963) ont montré que la concentration du pollen sur le milieu de culture avait une influence sur le pourcentage de germination observé ; plus la densité est élevée, plus le développement des tubes polliniques est favorisé. Colas et Mercier (1994a) obtiennent des résultats semblables avec le pollen de bouleau de même que

Tableau 4. Évolution du pH d'une solution de saccharose à 10 %, de pH initial variable, durant 24 heures d'incubation pour le test de germination *in vitro* du pollen de *Picea pungens* (extrait de Cram et Lindquist 1984)

pH initial des solutions	Heures d'incubation et pH des solutions			
	0,1 h	2 h	6 h	24 h
3,0	3,4	4,8	5,6	6,2
5,5	5,5	5,5	5,8	6,3
8,0	7,0	6,0	6,0	6,5

Tableau 5. Conditions du test de germination *in vitro* de pollens d'arbres forestiers

Espèce	Conditions du test de germination *in vitro*						Référence
	Réhydratation	Composition du milieu du culture	pH	Durée de la culture	Lumière	Température de la culture	
Picea pungens	non	10 % saccharose 1,5 % agar	4	30 h	non	25 °C	CRAM et LINQUIST 1984
Pinus pinaster *Pinus pinea*	24 h à 25 °C	9 % saccharose 0 % agar	6,4	48 h	non	25 °C	CELA RENZONI et VIEGI 1991
Pseudotsuga menziesii	16 h à 26 °C	8,09 mM H_3BO_3 1,27 mM $CA(NO_3)_2$ 1,0 mM KNO_3 1,45 mM $MgSO_4$	4,3 à 6,1	48 h	non	25 °C	CHARPENTIER et BONNET-MASIMBERT 1983
Juglans regia	3 h à 25 °C	20 % saccharose 0,65 % agar 0,16 mM H_3BO_3 1 mM $CaCl_2$	N.D.[1]	24 h	non	25 °C	LUZA et POLITO 1985
Populus deltoides *Populus nigra*	non	10 % saccharose 0,6 % agar	N.D.[1]	10 h	non	23 °C	RAJORA et ZSUFFA 1985
Populus maximowiczii	non	20 % saccharose 0,6 % agar	N.D.[1]	10 h	non	23 °C	RAJORA et ZSUFFA 1985

[1] N.D. : non déterminé.

Ahlgren et Ahlgren (1978) avec du pollen de pin blanc. Ce phénomène a pour conséquence de produire des résultats variables si on ne tient pas compte de la densité d'ensemencement. Il est donc très important, en réalisant des tests de germination *in vitro*, d'utiliser des conditions constantes de densité d'ensemencement.

L'interprétation des résultats d'un test de germination *in vitro* doit être faite avec prudence. Un faible pourcentage de germination est souvent attribuée à la mauvaise qualité du pollen. Mais ce résultat s'observe lorsque les conditions de culture ne sont pas adaptées à l'espèce testée. Les besoins pour la germination varient beaucoup entre les espèces. De plus, les besoins d'un même échantillon de pollen peuvent varier après que celui-ci ait subi un stress comme la conservation (Polito et Luza 1988).

1.4 Évaluation de la viabilité du pollen par un test de germination *in vivo* (ou test de fécondité)

Pour de nombreux auteurs, la réalisation d'un test de germination *in vivo* fournit la vraie réponse quant à la viabilité de l'échantillon testé (Towill 1985, Digonnet-Kerhoas et Gay 1990, Webber et Bonnet-Masimbert 1993). On parle alors de fécondité. La mesure de la germination peut consister en une simple mesure visuelle du tube pollinique en croissance à l'intérieur de la fleur femelle (Martin 1959, Shellhorn *et al.* 1964) ou en un dénombrement des graines produites consécutivement à une pollinisation dirigée*. La première technique est rarement utilisée avec le pollen des arbres forestiers ; elle ne sera donc pas décrite ici.

La principale précaution à prendre dans les croisements dirigés est de s'assurer que du pollen étranger ne se déposera pas sur les fleurs. Conséquemment, ces fleurs seront ensachées avant le moment de leur réceptivité. La fécondité est déterminée par le rapport entre le nombre de graines pleines produites et le nombre total de graines. L'évaluation du rendement en graines donne un indice de la fécondité réelle de l'échantillon de pollen testé mais ne permet pas de déterminer le pourcentage de grains germés dans la population (Digonnet-Kerhoas et Gay 1990). Par ailleurs, cette technique n'est pas pratique compte tenu du très grand laps de temps qui s'écoule entre le moment de la pollinisation et l'obtention des résultats (entre quatre mois et deux ans selon les espèces). Ce type de test est donc, le plus souvent, utilisé à des fins de recherche. De nombreux facteurs intrinsèques ou extrinsèques peuvent être à l'origine d'un avortement éventuel des graines, par exemple l'état physiologique de la fleur femelle au moment de la fécondation (Hagman 1975), la compatibilité génétique du pollen avec l'arbre hôte (Owens et Blake 1985) et les déviations morphophysiologiques qui peuvent survenir après la fécondation comme les changements hormonaux (Takao 1960, Sarvas 1962), la compétition pour les éléments nutritifs (Lyons 1956, Burdon et Low 1973) et l'eau (Rehfeldt *et al.* 1971, Sweet 1973) ainsi que les conditions environnementales (Sarvas 1962, Dogra 1967, Kosinski 1987, Ferrand 1988) et les infestations par des insectes (Mercier *et al.* 1991). Il n'est donc pas possible de déterminer par cette technique le pourcentage réel de viabilité du pollen. Toutefois, la germination *in vivo* permet de connaître le « pouvoir de fécondation » des grains de pollen, ce que ne peuvent faire les tests de germination *in vitro*.

1.5 Corrélations entre les différentes techniques servant à évaluer la viabilité du pollen

1.5.1 Comparaison des tests de germination *in vitro* et des tests colorimétriques

Les auteurs d'une étude comparative réalisée sur différentes variétés de pollen de peuplier (Rajora et Zsuffa 1985) mentionnent que la germination *in vitro* du pollen de peuplier dure dix heures alors que le résultat d'une coloration au TTC s'obtient en moins d'une heure. Cette justification est souvent évoquée pour appuyer des études comparatives. Dans le cas du peuplier, il existe une bonne corrélation entre les deux tests, bien que la valeur fournie par la coloration soit toujours plus élevée que celle du test de germination *in vitro* ; la principale différence s'observe entre les variétés. Le test au TTC est jugé fiable chez le pin (Cook et Stanley 1960) mais ces observations sont contredites par Mercier (1990). Il semble que la technique du test FCR, également utilisée dans les études sur le pollen d'arbres forestiers, soit l'un des meilleurs tests colorimétriques (La Porta et Roselli 1991).

Käpylä (1991) compare l'efficacité de différentes méthodes de coloration pour déterminer la viabilité d'échantillons de pollen d'espèces anémophiles. Il constate que le pourcentage de germination *in vitro* peut être nul alors que les grains présentent toujours une coloration normalement associée à la viabilité. Cette observation montre en fait que les résultats estimés à l'aide des tests colorimétriques surestiment les valeurs obtenues par les tests de germination *in vitro*. Ce phénomène tend à démontrer la différence qui existe entre un « test de viabilité » et un « test de germination ».

1.5.2 Comparaison des tests de germination *in vitro* et des tests biochimiques

La teneur du pollen en ATP est directement liée au pourcentage de germination *in vitro* de ce même pollen. Cette corrélation a été établie par Ching *et al.* (1975) avec le douglas taxifolié, le sapin noble et la pruche de l'Ouest.

Sur des échantillons conservés, le pourcentage de glucides et d'acides organiques endogènes est directement lié à la capacité de l'échantillon à germer *in vitro* (Stanley et Pootschi 1961).

Ching et Ching (1976) ont montré que la conductivité d'un filtrat de pollen révèle, avec une bonne fiabilité, la capacité de celui-ci à germer. En effet, il existe une bonne corrélation entre la conductivité du filtrat et sa teneur en sucres et en acides aminés (dosage par le réactif d'anthrone). Il faut toutefois se rappeler que plus cette teneur est forte, moins la germination du pollen est élevée. Foster et Bridgwater (1979) aboutissent au même résultat avec le pin à l'encens.

Les tests biochimiques permettent d'évaluer rapidement la viabilité du pollen. Cela permet un gain de temps appréciable, ce qui n'est pas à négliger lorsqu'on sait que le délai entre la dissémination du pollen et la réceptivité des fleurs femelles est souvent très court.

1.5.3 Comparaison des pourcentages de germination et de fécondité

Dans une pollinisation naturelle, le tube pollinique rencontre un environnement complexe et changeant au cours de sa croissance. Dans un milieu de culture synthétique, ces contraintes sont absentes. Ainsi, la germination *in vitro* ne pourra pas forcément être représentative de ce qu'on observe dans les conditions naturelles. Un bon exemple illustrant ce fait concerne la mesure des tubes polliniques émis dans les conditions artificielles. Sorensson et Nagahara (1989) et Oni (1990) ont mesuré la longueur des tubes polliniques émis *in vitro*. Dans les deux cas, ces tubes avaient une longueur insuffisante pour atteindre les tissus femelles et effectuer la fécondation. On a étudié le pollen du pacanier (*Carya illinoensis* Koch [*C. olivaeformis* Nutt.]) afin de comparer le pourcentage de germination *in vitro* et le pourcentage de graines formées après des pollinisations effectuées avec ce même pollen (Yates 1990). L'évaluation de la germination *in vitro* produit toujours des valeurs supérieures à celles qu'on observe *in vivo* (Foster et Bridgwater 1979). À l'instar des tests de viabilité qui surestiment les résultats par rapport aux tests de germination *in vitro* (voir section 1.5.1), on peut penser que ce dernier type de test surestime à son tour les valeurs par rapport à celles qu'on observe dans la nature.

Chapitre deux

Influence de la teneur en eau sur la viabilité et la conservation du pollen

Au moment de son émission, le pollen se trouve dans un état de déshydratation important qui varie selon les espèces. Par exemple, la teneur en eau du pollen de peuplier est de l'ordre de 6 % (Dumas *et al.* 1984) et celle du douglas taxifolié se situe entre 5 et 10 % (Charpentier et Bonnet-Masimbert 1983). La perte d'eau a lieu au cours des stades finaux de la maturation avant l'anthèse* et se poursuit dans l'air (Heslop-Harrison 1979b, Crane 1986), sans toutefois dépasser un seuil au-delà duquel on observe une perte de viabilité (Polito et Luza 1988). La déshydratation place le pollen dans un état de ralentissement de son métabolisme pour conserver sa viabilité jusqu'à la réalisation de la pollinisation (Heslop-Harrison 1987). Dans des conditions naturelles, cette perte d'eau ne provoque pas de désorganisation irréversible des membranes de la cellule végétative, mais ces changements structuraux modifient la perméabilité de celle-ci. Ainsi, le plasmalemme* devient inefficace comme barrière osmotique. La capacité à germer est déterminée par la possibilité de la membrane à retrouver son intégrité lors de la pollinisation ou de la mise en culture (Shivanna et Heslop-Harrison 1981). La réorganisation de la membrane est provoquée par une hydratation qui lui permet de retrouver sa structure normale, donc sa perméabilité, et permet ainsi à la cellule d'avoir un fonctionnement normal (Barnabás 1985).

2.1 Teneur en eau du pollen

L'importance de la teneur en eau du pollen a déjà été soulignée dans le paragraphe 1.3.1.1. Celle-ci joue un rôle prépondérant dans le maintien de la viabilité du pollen au cours de sa conservation. Réduire la teneur en eau d'un grain de pollen diminue fortement sa respiration (Hoekstra et Bruinsma 1975). La structure des pollens tricellulaires leur confère une fragilité importante, notamment une faible résistance à la déshydratation ; les pollens bicellulaires sont plus résistants à une déshydratation poussée (Hoekstra et Bruinsma 1975, Cerceau-Larrival et Challe 1986, Cauneau-Pigot 1988). Toutefois, Bonnet-Masimbert *et al.* (1997) ont observé chez le mélèze qu'une déshydratation poussée cause une baisse importante de la viabilité du pollen évaluée par les tests de conductivité, de respiration et de germination chez le pollen non réhydraté. Ceci est partiellement réversible après une réhydratation pour le test de conductivité et de germination, mais non pour le test de respiration. Ce pourrait être l'indication qu'il existe une limite du niveau de déshydratation du pollen de mélèze avant sa conservation.

Lors de la récolte, il est fréquent de sécher les anthères ou les fleurs mâles dans le cas des conifères (Colas 1992). Ce séchage a un double rôle, il provoque ou accélère la déhiscence des anthères ou des sacs polliniques et permet la réduction de la teneur en eau du pollen (Towill 1985). La récolte des fleurs doit avoir lieu juste avant la déhiscence. En effet, c'est au cours des dernières heures que le pollen achève sa maturation et que sa teneur en eau est réduite (Lin et Dickinson 1984). Une récolte précoce nuit à la qualité du pollen. En effet, le pollen immature qui subit les mêmes traitements qu'un pollen normalement arrivé à maturité perd rapidement sa viabilité puisque ses membranes sont incapables d'assurer une bonne perméabilité (Hoekstra *et al.* 1988).

Dumas *et al.* (1983) ont mis au point une technique utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour déterminer la teneur en eau du pollen. Ils ont utilisé cette technique pour faire le suivi de la teneur en eau au cours de la perte de viabilité du pollen de chou (Dumas *et al.* 1986). Cette perte est associée à l'apparition d'une quantité croissante d'eau libre* qui est le signal de la désorganisation du plasmalemme. Lorsque les membranes internes ont peu d'eau pour maintenir leur intégrité, elles se désintègrent et le pollen meurt.

2.2 Maintien de la teneur en eau initiale du pollen au cours de sa conservation

Il est important de maintenir la plus basse teneur en eau possible tout au long de la conservation. Le maintien d'une faible teneur en eau du pollen de pin lors de l'extraction et durant la conservation limite la dégradation enzymatique des substrats endogènes essentiels à assurer la croissance initiale du tube pollinique (Stanley et Poostchi 1961). Les conditions de conservation qui assurent le maintien de la viabilité limitent l'action des enzymes qui dégradent les sucres simples : en effet, les grains de pollen de pin conservés qui ne germent pas ont une teneur en glucides plus faible que ceux qui germent.

Il est bon de préciser que le maintien d'une faible teneur en eau ne veut pas dire que la conservation doit se faire dans une atmosphère totalement sèche. Par exemple, Duffield (1954) a publié des résultats sur la conservation de sept espèces de pin. Après environ un an, les meilleures conditions de conservation sont observées à une humidité relative de l'air comprise entre 10 et 25 % et à une température située entre 0 à 5 °C. Toutefois, une humidité relative de l'air et une température de conservation élevées entraînent une perte rapide de la viabilité.

2.3 Réhydratation du pollen

La réhydratation est le prélèvement contrôlé d'eau par le grain de pollen ; c'est une étape préliminaire essentielle (Luza et Polito 1987). L'absorption d'eau par le grain est le premier stade de la régénération des membranes chez les grains déshydratés. Cette réhydratation donne le temps au plasmalemme du grain de pollen de se réorganiser. Le grain devient turgescent, ce qui est une condition initiale indispensable à sa germination (Shivanna et Heslop-Harrison 1981). La réhydratation s'accompagne d'une réactivation du métabolisme du grain. Une étude réalisée à l'aide d'un microscope électronique sur du pollen de douglas taxifolié (Charpentier et Bonnet-Masimbert 1983) montre que la réhydratation transforme des mitochondries ayant une structure typiquement inactive en des mitochondries plus allongées où le nombre de crêtes est en augmentation, ce qui traduit une forte activité métabolique. Le fait qu'une réhydratation du pollen permette de restaurer une activité de germination équivalente à celle du pollen frais montre que dans un schéma de conservation du pollen, on peut appliquer une déshydratation relativement poussée, tout en ne dépassant pas une certaine limite. Si les conditions de conservation ont été correctes, le pollen retrouve son potentiel initial de germination (Shivanna et Heslop-Harrison 1981).

De nombreux auteurs ont étudié l'influence de la réhydratation du pollen sur sa germination. La température à laquelle se fait cette réhydratation, ainsi que le pourcentage d'humidité relative auquel est alors soumis le pollen, ont une influence sur la viabilité du pollen traité. Chez le douglas, une réhydratation durant 16 heures dans une atmosphère saturée d'eau à une température de 25 °C permet de maximiser le pourcentage de germination (Charpentier et Bonnet-Masimbert 1983, Webber 1996). Pour la même espèce, la réhydratation réalisée dans une atmosphère à 70 % d'humidité relative et à une température de 10 °C restaure le mieux la perméabilité des membranes, mais le pourcentage de germination du pollen ainsi traité est inférieur à celui qu'on observe lorsque la réhydratation a lieu à 20 °C (Webber et Bonnet-Masimbert 1989). Ce résultat montre que la réhydratation n'aura un effet bénéfique que si elle se fait dans des conditions initialement bien définies. Jett et Frampton (1990) ont analysé l'influence d'une réhydratation préalable du pollen de pin à l'encens sur le pourcentage de germination *in vitro* : la teneur en eau du pollen augmente rapidement après 2 heures de réhydratation à 24 °C en atmosphère saturée, pour atteindre environ 20 %. Le pourcentage de germination *in vitro* devient maximal après un temps de réhydratation de 1,3 heure (dans les conditions décrites précédemment). Avant cette étude, l'évaluation de la germination du pollen de pin à l'encens se faisait après une réhydratation de 16 heures. La réduction de ce temps de traitement est donc très appréciable lorsque le pollen doit être utilisé rapidement.

Mellerowicz et Bonnet-Masimbert (1986) ont comparé l'effet de la réhydratation sur la germination *in vitro* ainsi que sur la germination *in vivo* du pollen de douglas. Ils ont pu démontrer que la réhydratation n'a pas le même effet bénéfique sur la germination *in*

vivo que celui observé *in vitro*. Il se peut que la teneur en eau idéale pour la germination *in vivo* soit différente de celle nécessaire à la germination *in vitro*. Quoi qu'il en soit, il ne semble pas nécessaire de réhydrater le pollen lors de travaux de croisements dirigés. De plus, il semble que l'humidification des grains de pollen avant la pollinisation favorise le développement d'agents pathogènes lesquels provoquent l'avortement des graines (Mellerowicz et Bonnet-Masimbert 1983). Le pollen non réhydraté est aussi beaucoup plus facile à manipuler.

Chez le pin blanc, le pollen réhydraté durant 24 heures à une humidité relative de l'air à 95 % et à température de la pièce augmente le pourcentage de germination *in vitro* d'environ 25 % (Ahlgren et Ahlgren 1978).

Chapitre trois

Conservation du pollen

Les grains de pollen ont une durabilité physique remarquable et sont biochimiquement inertes. C'est l'un des matériels les plus résistants du monde organique à condition d'en bien maîtriser les conditions de conservation (Bajaj 1987). Toutefois, il n'en demeure pas moins que la conservation de leur viabilité est relativement difficile à maintenir au-delà de quelques années, parfois même de quelques jours. En général, les grains de pollen qui sont recueillis, extraits et séchés correctement se conservent bien alors que même l'emploi des meilleures techniques ne permettra pas de conserver des grains de pollen qui ont été mal manipulés (Mercier et Stipanicic 1990).

La conservation du pollen a pour but « [...] *de maintenir, sur un long intervalle de temps, la capacité à féconder et à produire une descendance viable. Cela n'implique pas seulement de conserver l'intégrité des structures biologiques (par exemple le système membranaire), mais aussi les substances recouvrantes (tels les glycoprotéines, les glycolipides, les pigments caroténoïdes, etc.) qui font partie du système de reconnaissance mis en jeu lors de la germination* in vivo. » (Cerceau-Larrival et Challe 1986).

La conservation du pollen a donc essentiellement deux objectifs. Le premier est d'obtenir des collections de pollens très variés, notamment d'espèces menacées ou en voie d'extinction, de façon à conserver la variabilité génétique (Koopowitz et Kaye 1983). D'ailleurs, cette préoccupation augmente avec les années puisque les généticiens y trouvent des ressources qui seront utilisées pour leurs nouveaux programmes (Auriol 1992). Le second objectif concerne l'accumulation de « réserves » de pollen. Ces réserves pourront servir à compenser de mauvaises récoltes lors d'années de faible production pollinique, afin de ne pas retarder le programme d'amélioration génétique de l'espèce en cause. Ce pollen pourra aussi être utilisé dans des programmes de croisements entre des espèces à floraison décalée et permettre ainsi la production d'hybrides impossibles à produire par la voie naturelle (Griggs *et al.* 1971, Luza et Polito 1985, Bramlett et Matthews 1991, Philippe *et al.* 1991). La conservation dans le but d'acquérir des réserves de pollen peut être à son tour de deux types, soit :

— une conservation à court terme* qui correspond à une durée de quelques semaines ;

— une conservation à long terme* qui correspond à une durée supérieure ou égale à un an. Cette dernière est celle qui est la plus souvent utilisée pour conserver les ressources génétiques.

Avant d'envisager la conservation d'un échantillon de pollen, il est essentiel de déterminer son pourcentage de germination *in vitro*. En effet, il est inutile de conserver du matériel de mauvaise qualité.

3.1 Effet de la conservation sur la qualité du pollen

La conservation du pollen, pour des périodes plus ou moins longues et après des traitements assez draconiens, entraîne-t-elle des altérations physiologiques ou génotypiques ?

Comme nous l'avons déjà mentionné, les grains de pollen ont une résistance physique remarquable et ils sont biochimiquement inertes. Cette très grande résistance est due à la sporopollénine qui est le principal composé de l'exine (figure 2 ; Pons 1958, Brooks et Shaw 1978, Owens et Blake 1985, Cerceau-

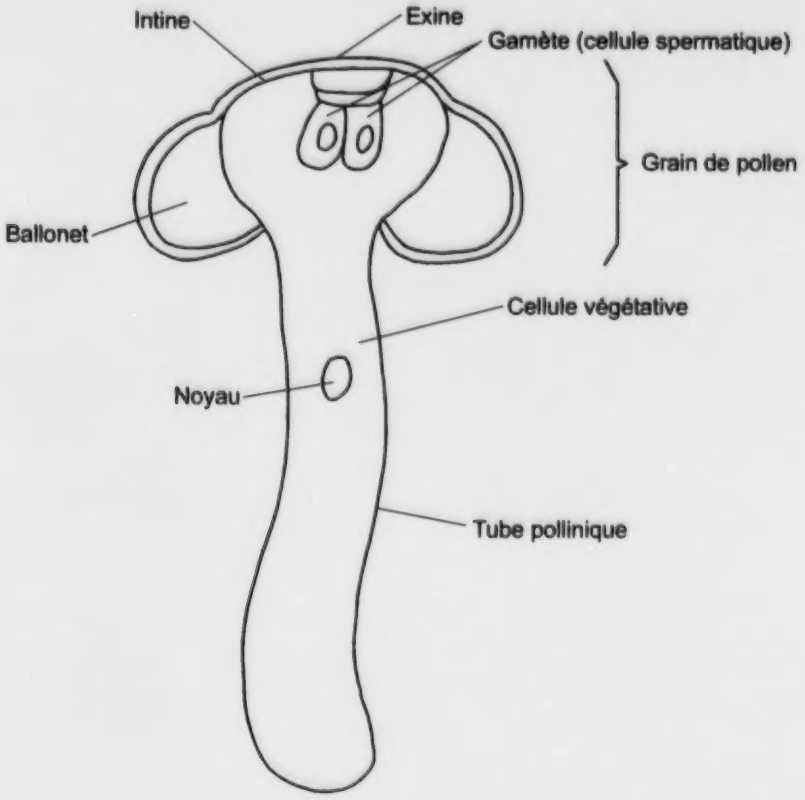

Figure 2. Les différentes parties d'un grain de pollen d'arbre résineux (à l'exception du mélèze et du douglas taxifolié).

Larrival et Hiddeux 1986, Abid 1991). Ce sont les qualités biochimiques et biophysiques de la sporopollénine (résistance, élasticité, légèreté) qui assurent la protection, en particulier contre les rayonnements ultra-violet, et la dispersion du matériel génétique inclus dans le pollen. C'est d'ailleurs cette même sporopollénine qui se fossilise dans les sédiments, alors que la membrane interne (l'intine), pectocellulosique, et le contenu cellulaire disparaissent.

Selon Wang (1975) la détérioration est surtout d'ordre physiologique et elle serait due à :

— l'épuisement des réserves respiratoires ;
— l'inactivation des enzymes, des nucléotides, des régulateurs de croissance et de l'acide pantothénique ;
— des lésions survenues durant la phase de dessiccation ;
— l'accumulation de déchets métaboliques ;
— l'auto-oxydation des lipides contenus dans l'exine du pollen.

La détérioration physiologique est principalement due à une diminution partielle ou totale de la capacité à synthétiser l'amidon et, par voie de conséquence, à provoquer l'allongement du tube pollinique. En fait, cette détérioration physiologique est étroitement liée à l'augmentation de la concentration de protéines dénaturées dans les grains de pollen (Bingham *et al.* 1964).

Il est bien entendu que la qualité du pollen conservé dépendra de sa maturité physiologique au moment de la récolte (Mercier 1990). De plus, le pourcentage de dégénérescence en cours de conservation dépendra de l'arbre-mère et des conditions environnementales lors de la récolte.

Les techniques de conservation ont donc pour objectif de contrer la détérioration physiologique du pollen. Conséquemment, on doit optimiser les conditions du milieu de conservation, de manière à bloquer toute activité du métabolisme, sans toutefois altérer les structures physiques et les composantes biochimiques du grain de pollen, notamment les molécules qui, au niveau de l'exine, assurent les mécanismes de reconnaissance lors de la pollinisation (Cerceau-Larrival et Challe 1986). Sept facteurs limitatifs doivent être pris en compte dans la conservation du pollen (Bajaj 1987) :

— la teneur en eau du pollen durant la conservation ;
— le mode de déshydratation ;
— le type de contenant utilisé ;
— la température de conservation ;
— la réalisation d'un vide (lors d'une lyophilisation) ;
— le mode d'acclimatation (principalement à la température ambiante) du pollen après la conservation ;
— le mode de réhydratation après la conservation.

Herman (1969) considère que la conservation du pollen à des températures cryogéniques peut entraîner des mutations. Une étude réalisée sur le pollen de la lignée T+d de *Petunia* (Farcy *et al.* 1990) a fait ressortir les caractères polydominants pour la coloration des pétales. Le pollen de cette lignée, lyophilisé et conservé à de faibles températures, a été utilisé pour réaliser des croisements avec une lignée polyrécessive pour les mêmes caractères. L'analyse de la descendance n'a pas permis de faire ressortir de modifications génétiques fondamentales (Farcy *et al.* 1990).

Le pollen conservé peut-il subir des altérations physiologiques ? Cerceau-Larrival et Challe (1986) préconisent la réalisation de croisements. Un raisonnement semblable est suivi par Digonnet-Kerhoas et Gay (1990) qui prônent la réalisation de pollinisations dirigées de manière à déterminer si une sélection génotypique a eu lieu après le traitement du pollen.

3.2 Facteurs influençant la conservation

3.2.1 Humidité relative de l'air ambiant

Le chapitre deux traitait spécifiquement de l'influence de la teneur en eau sur la viabilité du pollen.

3.2.2 Température de conservation

On admet généralement que la réduction de la température de conservation du pollen augmente sa durée de vie (Shivanna et Johri 1985, Bajaj 1987). Habituellement, les températures comprises entre 0 et 5 °C sont utilisées pour des conservations à court terme. À ces températures, le métabolisme est ralenti mais pas suffisamment pour permettre une conservation de longue durée (Bajaj 1987). Toutefois Bramlett et Matthews (1991) ont conservé du pollen de pin à l'encens durant 10 ans à 3 °C ; après ce délai, le pourcentage de germination *in vitro* observé était de 92 %. Plus la température est réduite, plus la durée de conservation du pollen augmente. Towill (1985) définit -20 °C comme la température idéale de conservation. De même, Lanteri *et al.* (1993) concluent qu'en général, une conservation du pollen à -18 °C peut être fort utile dans les programmes d'hybridation. En effet, la dissémination du pollen peut avoir lieu avant la réceptivité des fleurs femelles. La conservation du pollen permettrait donc la réalisation des croisements.

Une température comprise entre 0 et -80 °C provoque le phénomène de la cristallisation de l'eau ; la glace prend la forme de cristaux qui ont tendance à occuper un plus grand volume à l'intérieur de la cellule (Arès et Marcoux 1971). Certains travaux ont montré qu'un refroidissement trop rapide peut entraîner des lésions mécaniques qui induisent la pseudoplasmolyse* ainsi que la formation de cristaux de glace et de bulles d'air et des craquelures (Wang 1975, Owens et Blake 1985). À une température inférieure à -80 °C, l'eau se vitrifie en formant instantanément une glace qui ne prend pas d'expansion. Grâce à la structure hautement résistante du pollen, on a envisagé de le soumettre à des températures beaucoup plus faibles comme celle de l'azote liquide (-196 °C). On parle alors de cryoconservation. À cette température, toutes les activités métaboliques sont bloquées de manière à arrêter le vieillissement du pollen (Binder *et al.* 1974), ce qui devrait prolonger la durée de conservation (Mazur 1966). Selon Towill (1991), la cryoconservation consiste « à placer et à maintenir du matériel biologique à de faibles températures de façon à ce que la viabilité soit maintenue après le retour aux

conditions de température normale ». Le problème de maintenir des échantillons à des températures aussi basses est la présence éventuelle d'eau. Toutefois, la teneur en eau du pollen peut être réduite avant le traitement, par un séchage (Towill 1991). Par exemple, le pollen de *Clianthus formosus* doit absolument subir une déshydratation préalable de 3 heures avant d'être conservé dans l'azote liquide (Hughes et Lee 1991). Le pollen de douglas subit au préalable un séchage à l'air qui réduit sa teneur en eau aux environs de 4 à 7 % ; les échantillons sont ensuite plongés directement dans l'azote liquide (Copes 1985). Selon ce dernier auteur, c'est la simplicité de la méthode qui explique l'uniformité des résultats qu'il a observés avec le pollen conservé dans l'azote liquide. Après trois années de conservation, le pourcentage de germination *in vitro* est le même que lors de la récolte (Copes 1987).

Yates (1990) a utilisé du pollen de pacanier, conservé trois ans dans l'azote liquide, pour des croisements sur le terrain. Il a pu démontrer que l'utilisation d'un tel pollen n'influençait pas la grosseur des fruits. Par ailleurs, des chercheurs japonais (Ichikawa et Shedei 1971) ont réussi à maintenir la viabilité du pollen d'arbres feuillus dans l'azote liquide durant 5 à 7 ans avec des pourcentages de germination de l'ordre de 10 à 23 %.

3.2.3 Composition de l'atmosphère pendant la conservation

La qualité de l'atmosphère dans les flacons durant la conservation est un autre facteur dont il faut tenir compte. Son influence est notable sur la durée de conservation. L'exposition du pollen à l'oxygène a des effets négatifs sur la conservation (Stanley et Linskens 1974, Bajaj 1987). Pour minimiser la quantité d'oxygène en contact avec les échantillons, on utilise deux techniques : la première consiste à faire le vide alors qu'une seconde réside à remplacer l'air par un gaz inerte comme l'azote. Ces deux techniques permettent de prolonger la durée de vie des échantillons (Cerceau-Larrival et Challe 1986). Toutefois, les deux techniques ne sont pas applicables aux mêmes pollens ; quand l'une est valable, l'autre ne l'est pas (Towill 1985).

3.2.4 Type de pollen

Bien que les pollens des arbres feuillus et des arbres résineux appartiennent au même type bicellulaire, leur résistance aux manipulations et à la conservation est très différente. Le pollen des arbres feuillus est très fragile. Par exemple, le pollen de bouleau est très sensible à l'humidité, mais ne tolère pas les séchages (Colas et Mercier 1994a). De ce

Tableau 6. Différentes techniques de conservation de quelques pollens d'arbres forestiers

Espèce	Conditions de conservation du pollen				Référence
	Teneur en eau	Température	Durée de conservation	Remarque	
Bouleau verruqueux	N.D.[1]	- 80 °C	2,5 ans	Flacons sous vide	Bocquel 1994
Pin à l'encens	< 10 % 2 à 3 %	- 20 °C +3 °C	3 ans 10 ans	Flacons sous vide	Bramlett et Matthews 1991
Douglas taxifolié	4 à 7 %	- 196 °C	3 ans	Flacons scellés	Copes 1987
Épinette bleue du Colorado	N.D.[1]	- 18 °C	2 ans	Flacons scellés	Cram et Lindquist 1984

[1] N.D. : non déterminé.

fait, l'optimisation des conditions de conservation est plus complexe. Le pollen des arbres résineux a une résistance bien supérieure, il tolère beaucoup plus facilement des traitements à des températures élevées (Bramlett et Matthews 1991, Colas 1992, Colas et Mercier 1994b).

Le tableau 6 présente des références sur différentes techniques de conservation de quelques pollens d'arbres forestiers.

3.3 Les différentes techniques de conservation

3.3.1 La lyophilisation

La lyophilisation est une technique couramment utilisée pour la conservation de différents organes végétaux (Becwar *et al.* 1983, Ahuja 1986, Engelmann et Baubault 1986, Devallée *et al.* 1989). Elle s'est développée pour la conservation des pollens de tous types de végétaux (Cerceau-Larrival 1990). Cette technique permet d'éliminer à froid l'eau contenue dans le matériel végétal. Le principe consiste à mettre sous vide un échantillon congelé de manière à éliminer de l'eau par sublimation. King (1961, 1965) a été le premier à obtenir des résultats significatifs sur la conservation du pollen par cette technique. De façon à limiter les effets lésants de la lyophilisation sur le pollen, il est utile de réaliser une précongélation (à -30 °C) avant de soumettre l'échantillon au traitement (Pfeiffer 1955, King 1961). De même un séchage préalable peut être nécessaire. Le pollen de pin blanc ayant une teneur en eau de 40 % ne survit pas à la lyophilisation (Ching et Ching 1964). Le même pollen dont on a réduit la teneur en eau à 18 % demeure viable. Le séchage à l'air du pollen de pin, pour obtenir une teneur en eau de 8 à 10 %, augmente le temps durant lequel l'échantillon peut être lyophilisé sans dommages (Ching et Ching 1964). Chez le douglas, le meilleur prétraitement pour garantir un bon taux de survie à la lyophilisation consiste à réduire la teneur en eau du pollen à 8 % et à appliquer un refroidissement de 36 jours à 0 °C (Livingston et Ching 1967). Schoenike et Bey (1981) conseillent de conserver certaines espèces forestières (comme les pins et les eucalyptus) à l'aide d'une lyophilisation suivie d'une conservation en chambre froide. Ces auteurs pensent qu'il est possible de maintenir la viabilité de certaines espèces durant environ 50 ans. Ils ont obtenu des résultats concluants après 15 ans de conservation du pollen de pin gris.

Avant d'être utilisé pour réaliser des tests de germination *in vitro*, le pollen lyophilisé et conservé doit être réhydraté (Charpentier et Bonnet-Masimbert 1983). Cette réhydratation ne sera efficace que si les membranes du grain ont été peu altérées par la lyophilisation, c'est-à-dire si la perte d'eau n'a pas été trop importante (Cerceau-Larrival et Challe 1986).

3.3.2 Conservation dans des solvants organiques

L'utilisation de solvants organiques pour conserver le pollen a été peu étudiée. Selon Jain et Shivanna (1988), les solvants organiques confèrent des conditions de conservation anhydres et limitent la quantité d'oxygène disponible pour la cellule. Ces propriétés seraient adéquates pour que les solvants soient largement utilisés.

Iwanami (1972) a conservé du pollen de différents taxons dans des solvants comme l'acétone, le benzène et le chloroforme. À court terme, les résultats sont prometteurs, d'autant que les tubes polliniques produits par les pollens ainsi conservés sont plus longs que ceux produits par les témoins conservés au froid. Toutefois, Mishra et Shivanna (1982) ont montré que la conservation du pollen de fève et de pois dans des conditions de température et d'humidité contrôlées donne de meilleurs résultats que la conservation dans des solvants organiques . De plus, l'utilisation de solvants organiques pose un problème lors de croisements dirigés puisqu'il est nécessaire de séparer le solvant du pollen avant la pollinisation. En effet, la présence d'un solvant organique a des effets désastreux sur la fécondation (Cox 1988).

3.3.3 Conservation dans l'huile

Les huiles sont des liquides qui ne se mélangent pas à l'eau. Cette particularité leur confère les mêmes propriétés que les solvants organiques. Jain et Shivanna (1990) ont montré que le pollen de *Crotalia retusa* conservé dans différentes huiles organiques ou minérales montre des pourcentages de germination *in vitro* identiques à ceux du pollen conservé dans des solvants organiques. De plus, la conservation dans l'huile permet un meilleur maintien de la vigueur du pollen et elle est moins onéreuse. Les effets des huiles sur la fécondation sont cependant encore inconnus.

Deuxième partie

Gestion de la banque de pollen

Chapitre premier

Rôles d'une banque de pollen

L'importance d'une banque de pollen est indéniable. Une réserve de pollen est nécessaire à la réalisation de plusieurs travaux de pollinisation et de recherche (figure 3). La banque de pollen présente de nombreux avantages comme la conservation de grandes quantités de pollen et la représentation de très nombreux génotypes d'une même espèce. Plus spécifiquement, une banque de pollen permet :

— de faciliter les travaux de pollinisation artificielle lorsque le décalage phénologique entre la dissémination du pollen et la réceptivité des fleurs n'est que de quelques jours, ce qui est le cas de la majorité des arbres au Québec (Mercier 1995). En effet, une banque de pollen offre, pour la plupart des espèces, la possibilité de décaler d'au moins un an les étapes de récolte de pollen et de pollinisation, d'où une manipulation adéquate des fleurs mâles et du pollen. De plus, une banque permet de se pourvoir en pollen lors des mauvaises années florifères (Bonnet-Masimbert 1984, Powell 1989). Elle trouve encore toute son utilité lorsque les phénomènes de protogynie* se produisent ;

— d'effectuer des travaux de pollinisation artificielle à différents endroits dans le Québec ainsi que de permettre les échanges internationaux puisque le pollen traité en vue de la conservation est plus résistant à la manutention que le pollen frais. Par ailleurs, la possibilité de conserver du pollen des espèces exotiques permet d'envisager plus facilement des croisements avec les espèces indigènes ;

— de conserver les ressources génétiques dans l'optique de la diversité génétique (Schoenike et Bey 1981). En effet, une convention internationale sur la biodiversité signée au Sommet de la Terre à Rio en 1992 (Prescott 1994) stipule que la protection des espèces végétales peut être réalisée grâce à la mise en place de banques de matériel génétique sous forme de semences ou de pollen. En ce sens, Ottaviano et Mulcahy (1989) expliquent en détail les tenants et les aboutissants de l'utilisation du pollen dans un programme d'amélioration génétique et dans le maintien de la biodiversité ;

— de conserver des pollens récalcitrants, c'est-à-dire qui ont une durée de vie très courte (de quelques jours à quelques mois) ;

— de réaliser divers travaux de recherche sur le développement des fleurs mâles, la maturation du pollen, la mise au point de techniques de pollinisation, etc. De plus, d'autres travaux portant sur des sujets connexes — comme les études sur les allergènes, la pollution atmosphérique et la météorologie — sont facilités par l'existence d'une banque de pollen.

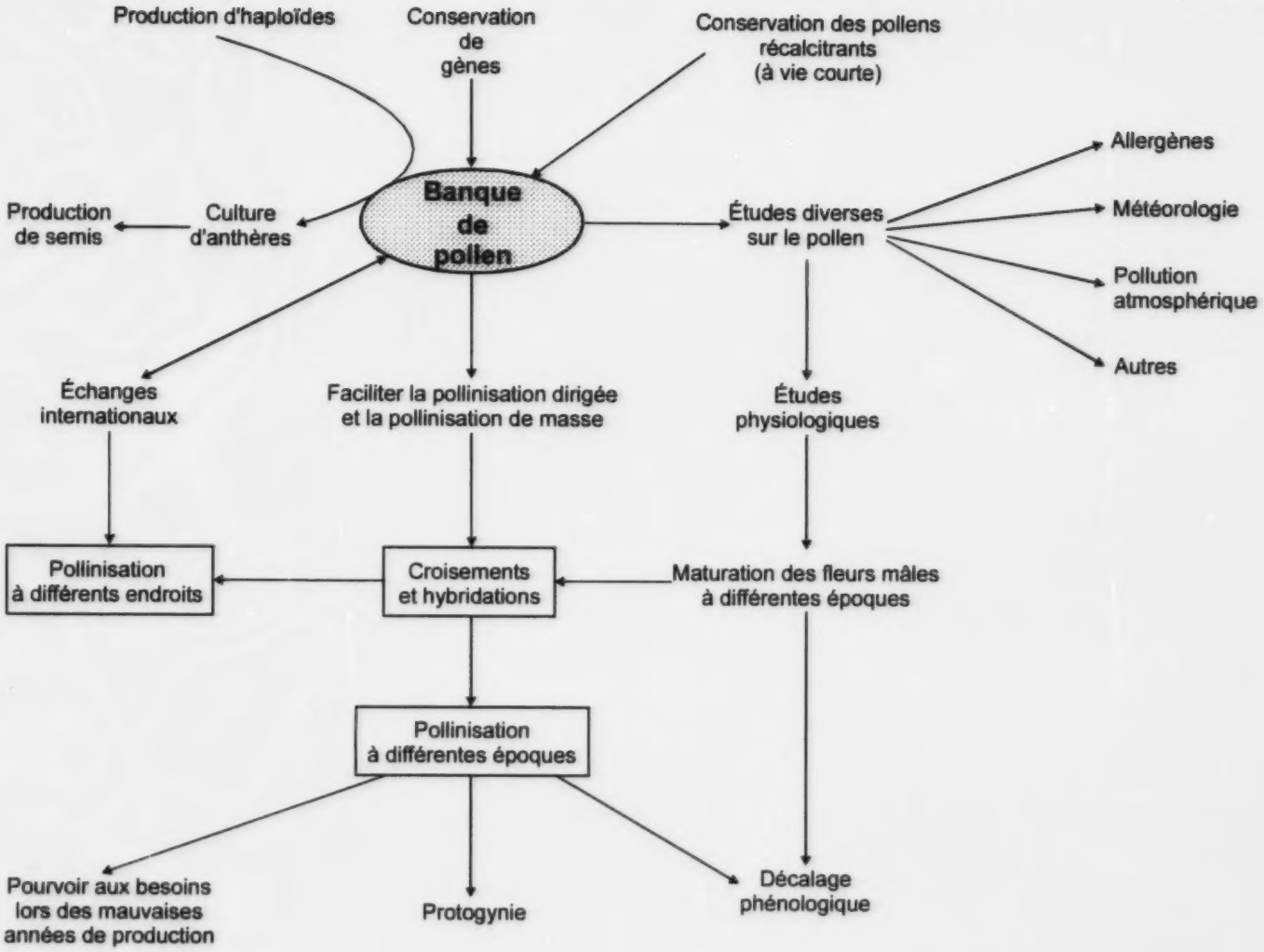

Figure 3. Différents rôles d'une banque de pollen.

Chapitre deux

Conservation du pollen

Le maintien de la viabilité du pollen est très délicat. En fait, le principal ennemi de la conservation du pollen est l'humidité. Il est donc important d'agir rapidement lors de la récolte des inflorescences mâles d'autant plus qu'il existe des variations selon les génotypes et que la durée de vie du pollen peut parfois être limitée. Ce principe semble à première vue évident mais il représente un défi de taille lorsque plusieurs centaines de lots arrivent en seulement quelques jours (Mercier *et al.* 1994). Les traitements servant à la conservation du pollen ont donc pour principal objet d'éliminer le maximum d'eau libre contenue dans les grains de pollen. Bien que les pollens des arbres résineux et feuillus appartiennent au même type cellulaire (soit bicellulaire) les traitements seront différents, de sorte que nous avons séparé la description des processus de conservation pour ces deux groupes. En effet, la structure même de l'exine des pollens d'arbres feuillus, plus fine que pour les résineux, confère cette fragilité qui les empêche de subir des séchages aussi draconiens que ceux des pollens des arbres résineux.

2.1 Processus de conservation des pollens d'arbres résineux

Le processus de conservation du pollen des arbres résineux est présenté sous forme d'organigramme à la figure 4.

2.1.1 Récolte des cônes mâles

La récolte doit toujours se dérouler en l'absence de précipitations en raison de l'impact négatif que peut avoir l'eau sur la viabilité du pollen. De plus, la pluie a tendance à projeter le pollen au sol, ce qui réduit le rendement en pollen des cônes mâles au moment de la récolte. Les inflorescences mâles sont récoltées juste avant la déhiscence des sacs polliniques, c'est-à-dire lorsque les grains de pollen sont arrivés à maturité (figures 5 et 6). Les équipes de travail récoltent les fleurs mâles manuellement dans des sacs en papier kraft qui sont ensuite placés dans une glacière. Les lots sont expédiés la journée même à une salle d'extraction ou, si ce n'est pas possible, ils sont conservés dans des dessiccateurs contenant de la *Drierite* (agent dessiccant préalablement réactivé) à 4 °C et à l'obscurité jusqu'à leur expédition le lendemain.

2.1.2 Premier séchage

Dès leur arrivée au laboratoire, les inflorescences doivent subir un premier séchage destiné à éliminer l'eau libre contenue dans les sacs polliniques de manière à les faire éclater et permettre ainsi la libération du pollen. Pour ce faire, les échantillons sont placés dans un séchoir à convection où la température est maintenue à 30 °C durant une période de 16 heures (figure 7). Les inflorescences sont transférées dans des tamis ayant pour base une fine toile à mailles soudées de type *Monoloron* fournie par la *Société Tripette et Renaud* (voir annexe I). Les mailles ont une taille de 35 µm afin d'empêcher les fuites de pollen. Les tamis sont recouverts d'un papier mouchoir qui empêche les contaminations entre les échantillons (figure 8). En région, les cônes mâles peuvent demeurer dans les sacs en papier au cours du séchage.

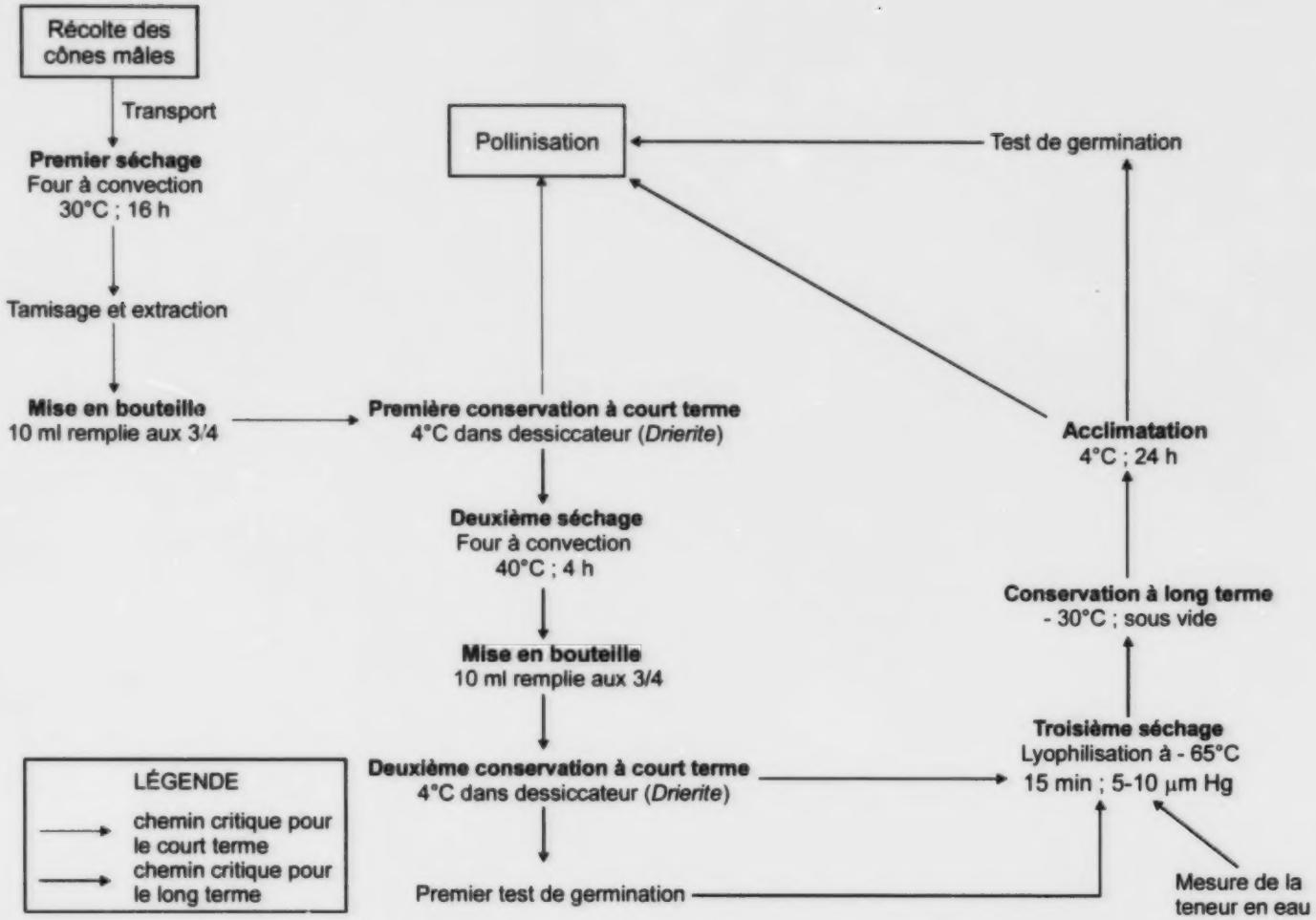

Figure 4. Processus de conservation à court et à long terme du pollen des arbres résineux.

Dans le cas d'une récolte en région, où les tamis utilisés au laboratoire ne sont pas disponibles, les inflorescences peuvent être laissées dans le sac en papier. La quantité d'inflorescences ne doit pas former une couche de plus de 2 cm. Le sac est coupé à 5 cm de hauteur et recouvert d'un *Kimwipes* (figure 8) afin d'éviter des contaminations entre les lots (Francis Gagnon, communication personnelle). Les sacs sont placés dans le séchoir pendant 16 heures.

2.1.3 Tamisage

Après ce premier séchage, les pollens sont extraits par brassage dans des tamis dont le diamètre des mailles varie de 45 à 106 µm selon les espèces (tableau 7). De manière générale, les inflorescences mâles sont seulement brassées à l'intérieur des tamis, ce qui est suffisant pour en extraire le pollen. Dans certains cas où il serait important d'extraire le maximum de pollen, par exemple des lots de génotypes importants, il est possible d'écraser à la main les inflorescences contre la grille du tamis. Toutefois, cette technique est à proscrire dans les opérations régulières puisqu'elle a tendance à introduire beaucoup d'humidité qui pourra entraîner une baisse du pourcentage de germination du lot ainsi qu'incorporer des champignons dans celui-ci.

Toute l'opération s'effectue sous des hottes aspirantes qui sont nettoyées à l'aide d'un jet d'air puis stérilisées à l'alcool (70 %) avant chaque nouvelle extraction (figure 9). Les tamis sont aussi nettoyés et stérilisés à l'alcool entre chaque extraction. Ces précautions sont prises pour empêcher la contamination entre les lots.

2.1.4 Conservation à court terme

Une partie du pollen peut alors être immédiatement utilisée dans les travaux de pollinisation. Dans le cas d'échantillons de faible volume, l'extraction est assez rapide à réaliser. Ainsi, une seule journée est nécessaire au traitement du pollen, ce qui retarde peu la réalisation des pollinisations. Pour les échantillons de plus gros volume, le temps de manutention est plus long, ce qui provoque un délai supplémentaire entre la récolte et l'utilisation possible de ce pollen pour réaliser les croisements. Après l'extraction, les échantillons sont répartis dans des flacons de type pénicilline de 10 ml (voir annexe 1) remplis aux trois quarts (figure 10). De manière générale, les pollens des arbres résineux peuvent être conservés à court terme — c'est-à-dire durant environ un mois — avant d'être utilisés pour des pollinisations ou pour leur traitement en vue de la conservation à long terme.

Chacun des flacons est fermé hermétiquement par un bouchon en caoutchouc (figure 11 ; voir annexe I). Ces bouchons sont transpercés à l'aide d'une aiguille de seringue (aiguille hypodermique stérile de 9 mm de long) servant à l'évacuation de gaz — probablement de l'éthylène responsable de la maturation et du gaz carbonique résultant de la respiration cellulaire — libérés par les pollens dans les jours suivant leur récolte (figure 12). Cette précaution est nécessaire pour éliminer les fortes concentrations de gaz dont l'effet sur la conservation à court terme est mal connu. Ces aiguilles sont enlevées après une semaine. De plus, Colas (1992)

Tableau 7. Gabarit des tamis servant à l'extraction du pollen pour les principales espèces utilisées dans le Programme d'amélioration génétique des arbres

Espèces	Dimension des mailles (µm)	Densité des mailles (*mesh*)[1]
Bouleau	45	325
Épinette blanche Épinette de Norvège	106	150
Épinette noire Épinette rouge	72	200
Mélèze	106	150
Noyer	45	325
Peuplier	45	325
Pin	63	250

[1] *Mesh* = nombre d'ouvertures au *pouce* carré.

Figure 5. Cônes mâles d'épinette blanche.

Figure 6. Inflorescences mâles déhiscentes de bouleau jaune.

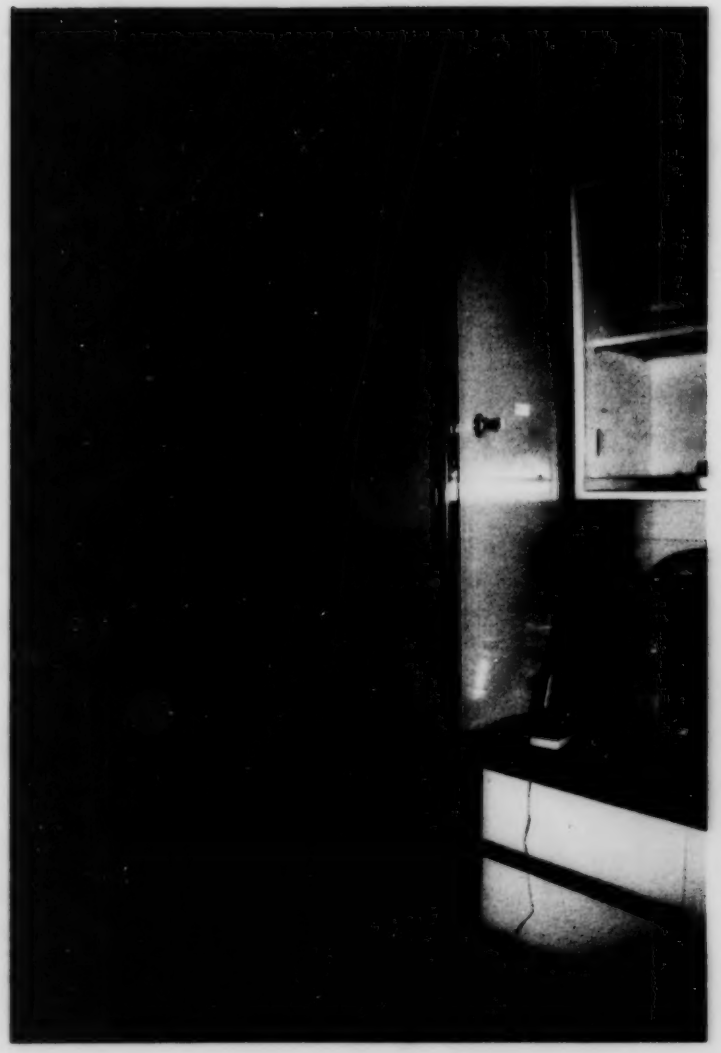

Figure 7. Séchoir à convection utilisé lors du premier séchage des cônes mâles.

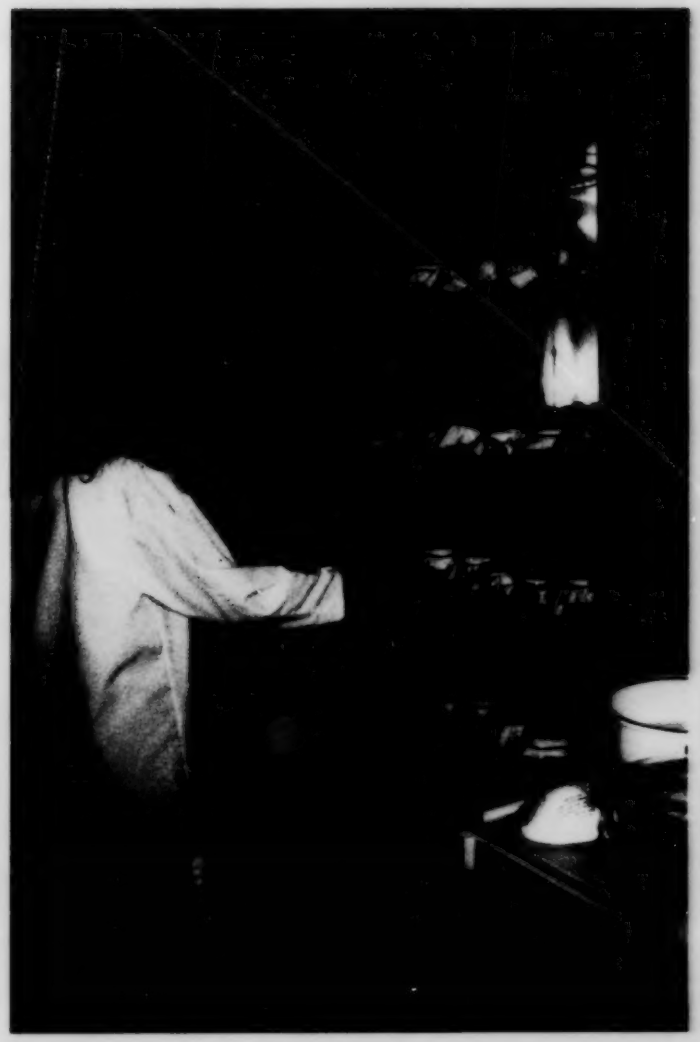

Figure 8. Séchage des cônes mâles préalable au tamisage du pollen.

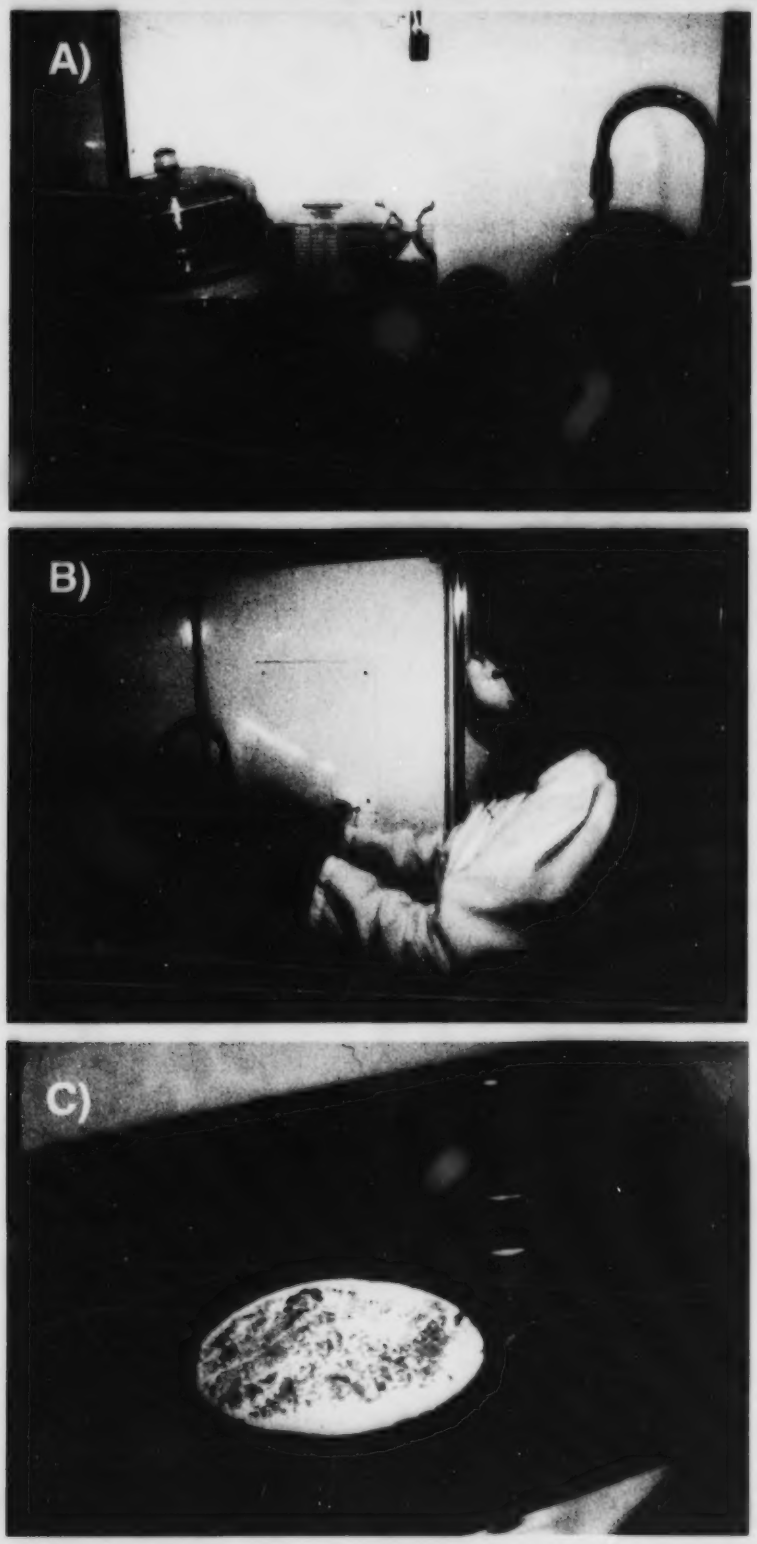

Figure 9. Étapes nécessaires au tamisage du pollen : a) vue d'ensemble du matériel ; b) tamisage du pollen ; c) pollen tamisé.

a démontré qu'il n'est pas nécessaire d'insérer un morceau de coton hydrophobe à l'extrémité de cette aiguille pour empêcher tout risque de contamination entre les échantillons.

Pour éviter que l'humidité de l'air ne vienne au contact du pollen, les flacons doivent être conservés dans un dessiccateur contenant de la *Drierite*, qui est gardé à l'obscurité à 4 °C.

2.1.5 Second séchage

Les pollens destinés à la conservation à long terme subissent un second séchage servant à éliminer l'eau libre contenue dans les grains. Le pollen est déposé en une couche mince et uniforme dans un cylindre en chlorure de polyvinyle (*PVC*) — d'un diamètre intérieur de 10 cm — dont les ouvertures sont fermées par une toile en nylon *Monotoron* à fils soudés en mailles de 35 µm provenant de la *Société Tripette et Renaud* (figures 13 et 14 ; voir annexe I). Ces toiles sont maintenues par un collet métallique ajustable. La toile supérieure a pour objet d'éviter toute contamination entre les échantillons alors que la toile inférieure a pour objet d'éviter les fuites. Une feuille de papier *Kraft* tapisse l'intérieur du cylindre afin d'éviter la présence d'électricité statique entre le pollen et la paroi du contenant, qui entraîne des pertes importantes de pollen lors des transferts.

Le traitement consiste en un séchage à 40 °C durant 4 heures dans un four ventilé. L'expérience nous montre que ce second séchage est nécessaire et qu'il ne nuit pas à la viabilité du pollen des arbres résineux (Mercier 1990, Colas 1992). À la fin de cette étape, la teneur en eau du pollen se situe normalement en-deçà de 10 %. Les échantillons sont répartis par la suite dans des flacons de type pénicilline de 10 ml remplis aux trois quarts de façon à faciliter la lyophilisation qui sera réalisée ultérieurement. Les flacons sont conservés sous vide dans un dessiccateur contenant de la *Drierite*, à l'obscurité et à 4 °C.

2.1.6 Test de germination et test de viabilité

Il est nécessaire de déterminer la viabilité du pollen avant sa conservation. En effet, il est inutile de conserver des échantillons de mauvaise qualité.

Après le second séchage, une très faible quantité de pollen est prélevée (environ 0,05 cm^3), pour être destinée aux tests de germination ou aux tests de viabilité selon le cas. Cette partie est traitée en détail au chapitre trois.

2.1.7 Mesure de la teneur en eau

Il est rare que la teneur en eau soit mesurée sur un lot donné en cours de conservation. Toutefois, nous présentons à titre indicatif la méthode retenue pour l'évaluer.

La mesure de la teneur en eau par différence entre la masse fraîche et la masse sèche fournit des résultats très reproductibles lorsque le pollen est séché à l'aide d'une lampe à infrarouges. Cette technique consiste en un séchage complet du pollen sans toutefois éliminer l'eau de constitution* des parois et des molécules ; elle présente également l'avantage de ne demander qu'une faible quantité de pollen pour sa réalisation (environ 100 mg).

La teneur en eau (TE) du pollen est déterminée à partir d'une moyenne de quatre répétitions où l'on mesure la différence entre la masse fraîche et la masse sèche selon la formule suivante :

$$TE\,(\%) = \frac{(\text{masse humide} - \text{masse sèche})}{\text{masse humide}} \times 100 \qquad [1]$$

La technique mise au point pour sécher le pollen à l'aide des infrarouges consiste dans un premier temps à faire sécher des morceaux de papier filtre (4 x 4 cm) durant une minute sous une lampe de 6,5 W de puissance. Cette étape permet d'éliminer l'eau contenue dans les fibres du papier. Par la suite, un échantillon de 100 mg de pollen est déposé sur le papier puis séché à son tour durant 3 minutes à 6,5 W. Une seconde pesée de l'échantillon **immédiatement** après le séchage permet d'obtenir la masse sèche du pollen. Cette technique est fiable, avec un coefficient de variation inférieur à 3 % (Colas 1992).

Il faut éviter de soumettre le pollen à une exposition trop longue qui aurait pour conséquence de le calciner : la valeur de la teneur en eau ne serait plus alors représentative de la réalité.

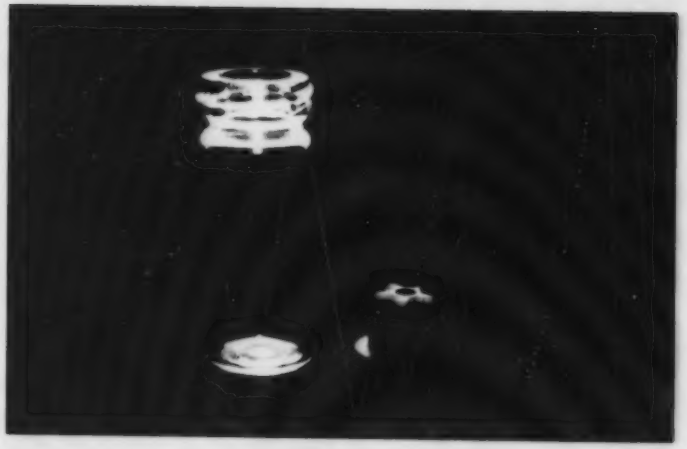

Figure 10. Flacon de type pénicilline de 10 ml (voir annexe I) utilisé pour la conservation à long terme du pollen. Le flacon doit être rempli aux trois quarts.

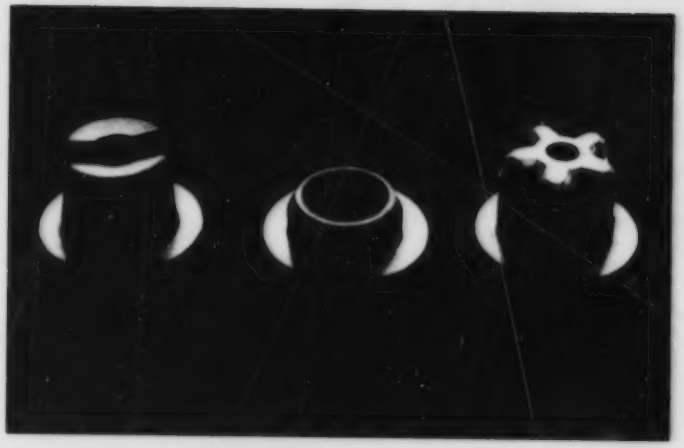

Figure 11. Différents types de bouchon en caoutchouc utilisés pour fermer hermétiquement les flacons de type pénicilline. Les bouchons A et B sont peu efficaces pour maintenir un vide prolongé à l'intérieur du flacon alors que le bouchon étoilé C (voir annexe I) permet de maintenir une parfaite étanchéité.

Figure 12. Flacons fermés à l'aide de bouchons transpercés par une aiguille afin de permettre l'échappement des gaz formés au cours des sept premiers jours de conservation du pollen.

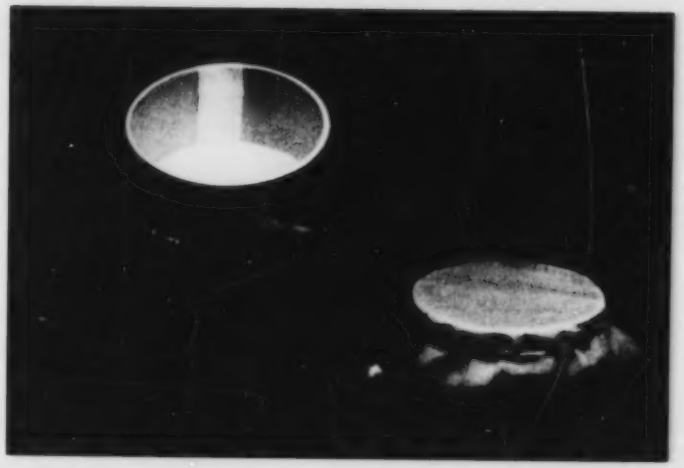

Figure 13. Contenant utilisé lors du second séchage du pollen.

2.1.8 Lyophilisation et conservation à long terme

La lyophilisation est un procédé de dessiccation, par congélation à très basse température suivie d'une sublimation sous vide (c'est-à-dire d'une évaporation directe d'un solide sans passer par la phase liquide) qui élimine l'eau libre contenue dans les grains de pollen et dans leur environnement. Cette lyophilisation correspond à un troisième et dernier séchage du pollen (figure 15). De plus, la lyophilisation permet de créer un vide qui sera maintenu à l'intérieur des flacons durant toute la durée de la conservation du pollen.

Les échantillons sont trempés aux trois quarts durant environ une minute dans l'azote liquide (-196 °C). Le pollen ne doit pas entrer en contact direct avec l'azote liquide afin d'empêcher une réaction éventuelle qui expulserait le pollen à l'extérieur du flacon au cours de la lyophilisation. Pour cette raison, les flacons doivent être fermés hermétiquement lors de leur immersion (figure 16). Il est impossible d'utiliser des contenants de grand volume pour la conservation. En effet, comme le pollen ne peut entrer en contact direct avec l'azote liquide, un trop grand volume créerait un effet d'isolation qui empêcherait d'obtenir rapidement une température homogène dans le contenant.

Par la suite, la lyophilisation a lieu à –65 °C durant 15 minutes à partir du moment où la pression contenue dans le lyophilisateur a atteint un vide équivalent à 5 ou 10 mm de Hg. Il est très important de ne pas laisser le pollen des arbres résineux dans le lyophilisateur durant plus de 25 minutes. Les flacons sont fermés hermétiquement à la fin de la séance de lyophilisation de sorte que le vide créé à l'intérieur des bouteilles soit identique à celui présent dans le lyophilisateur. Colas (1992) démontre que les échantillons peuvent être lyophilisés plusieurs fois consécutives sans que le pourcentage de germination ne soit altéré.

Les échantillons sont par la suite fichés sur ordinateur et conservés dans une chambre froide maintenue à –30 °C (figure 17). Ces conditions de conservation sont établies afin de maintenir la viabilité du pollen durant une période supérieure à un an.

2.1.9 Prélèvement de pollen

Le prélèvement des échantillons se fait en procédant à une acclimatation des lots. Ceux-ci sont déposés dans un dessiccateur placé à son tour dans un réfrigérateur maintenu à 4 °C durant 24 heures.

Un second test de germination — ou de viabilité pour les mélèzes — est réalisé afin de mesurer la qualité du pollen à la sortie de la banque.

2.2 Processus de conservation des pollens d'arbres feuillus

Les pollens des espèces feuillues ont des durées de vie beaucoup plus courtes que ceux des espèces résineuses. Leur résistance à la dessiccation et à l'humidité est très faible. Ainsi, il est impossible de leur appliquer les mêmes traitements de séchage que ceux des résineux. Les conditions suivantes ont été mises au point pour les pollens des bouleaux et des peupliers qui sont les deux principales espèces feuillues utilisées dans le Programme d'amélioration génétique des arbres. Quelques essais ont également été réalisés avec le pollen du noyer noir. Le processus de conservation du pollen des arbres feuillus est présenté sous forme d'organigramme à la figure 18 ; les modalités de conservation de celui-ci ont été élaborées en adaptant celles qui ont été mises au point pour les pollens des espèces résineuses.

2.2.1 Récolte des cônes mâles

La récolte des inflorescences mâles des espèces feuillues se fait de manière identique à celle décrite pour les espèces résineuses, c'est-à-dire qu'elle doit être réalisée juste avant la déhiscence des sacs polliniques.

2.2.2 Séchage et extraction

Le pollen des arbres feuillus, particulièrement les bouleaux, est très sensible à la dessiccation. Par exemple, le séchage des cônes mâles de bouleau pendant 16 heures à 30 °C (il s'agit des mêmes conditions déjà appliquées aux cônes mâles des espèces résineuses) entraîne une perte totale de viabilité (Colas et Mercier 1994a). La technique retenue pour le séchage préalable à l'extraction consiste à laisser les fleurs mâles dans les sacs de papier utilisés pour la récolte, durant 16 heures à la température de la pièce. Le pollen est ensuite extrait selon la même procédure que le pollen des résineux mais le tamis utilisé a un diamètre de mailles plus faible en raison de la plus petite taille du pollen de bouleau et de peuplier (tableau 7). Il est aussi possible d'obtenir du pollen sans avoir recours à un séchage ; il s'agit du pollen frais, libéré lors de la déhiscence naturelle des sacs polliniques. C'est de cette façon qu'est récolté le pollen de peuplier.

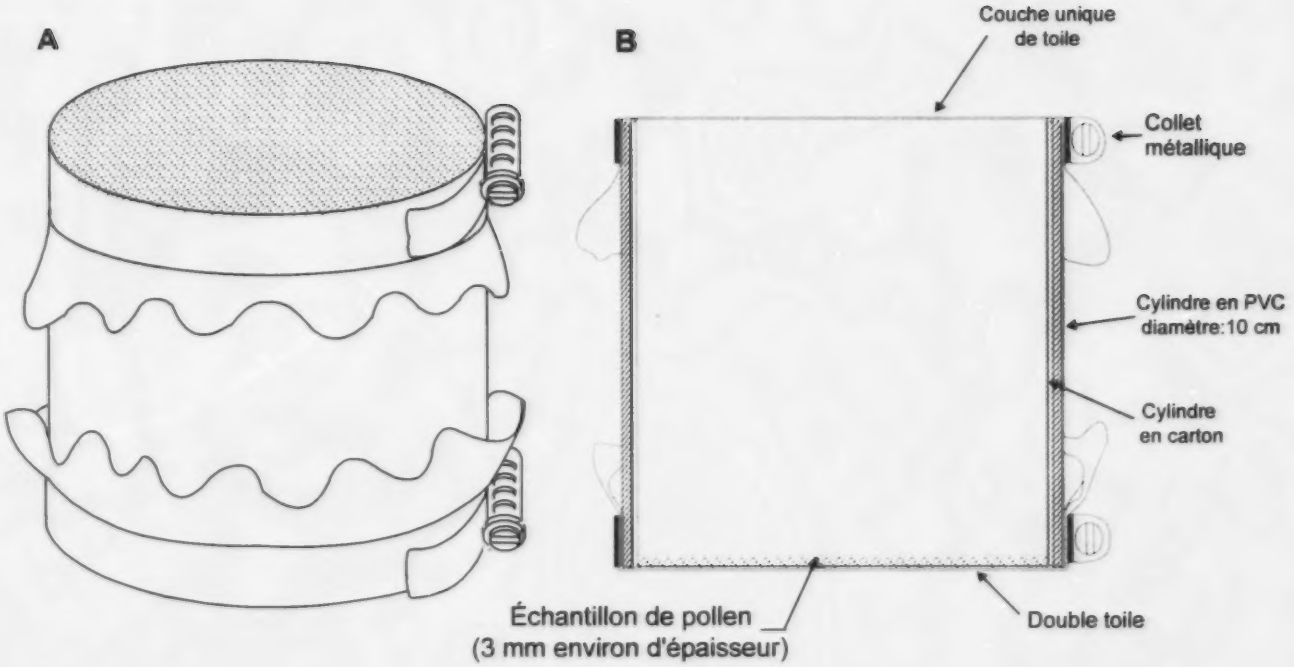

Figure 14. Contenant utilisé lors du second séchage du pollen : a) vue en trois dimensions ; b) coupe longitudinale du cylindre.

Figure 15. Lyophilisateur permettant de sécher à froid les échantillons de pollen destinés à la conservation à long terme.

Les échantillons sont ensuite répartis dans des flacons de type pénicilline de 10 ml remplis aux trois quarts (figure 10). Chacun des flacons est fermé hermétiquement par un bouchon de caoutchouc (figure 11). Ces bouchons sont transpercés à l'aide d'une aiguille de seringue (aiguille hypodermique de 9 mm de long) servant à l'évacuation de gaz libérés par les pollens dans les jours suivant leur récolte (figure 12). Ces aiguilles sont enlevées après une semaine de conservation. De plus, Colas (1992) démontre qu'il n'est pas nécessaire d'insérer un morceau de coton hydrophobe à l'extrémité de cette aiguille pour empêcher les risques de contamination entre les échantillons.

2.2.3 Conservation à court terme

Le pollen frais de bouleau peut être conservé à 4 °C en dessiccateur environ trois semaines (Colas et Mercier 1994a). Les pourcentages de germination du pollen extrait des inflorescences de bouleau séchées à l'air libre, tout en étant inférieurs à ceux observés avec le pollen frais, demeurent dans des limites raisonnables. La conservation à court terme est alors de 49 jours (Colas et Mercier 1994a). Le séchage à l'air libre des inflorescences est à retenir lorsqu'on veut extraire une grande quantité de pollen des inflorescences et lorsque la conservation prévue des échantillons est supérieure à trois semaines. Dans ces conditions, aucun traitement particulier (p.ex. : acclimatation, réhydratation, etc.) n'est nécessaire lors du prélèvement.

2.2.4 Conservation à long terme

Le pollen des espèces feuillues doit être immédiatement utilisé pour les travaux de pollinisation. En effet, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement permettant de conserver ce type de pollen durant plus d'un mois et demi ; ces pollens ne peuvent subir aucun séchage additionnel ni aucune lyophilisation. Actuellement, il apparaît que le meilleur traitement pour maintenir la viabilité du pollen durant au moins un an consiste à le plonger de façon permanente dans l'azote liquide.

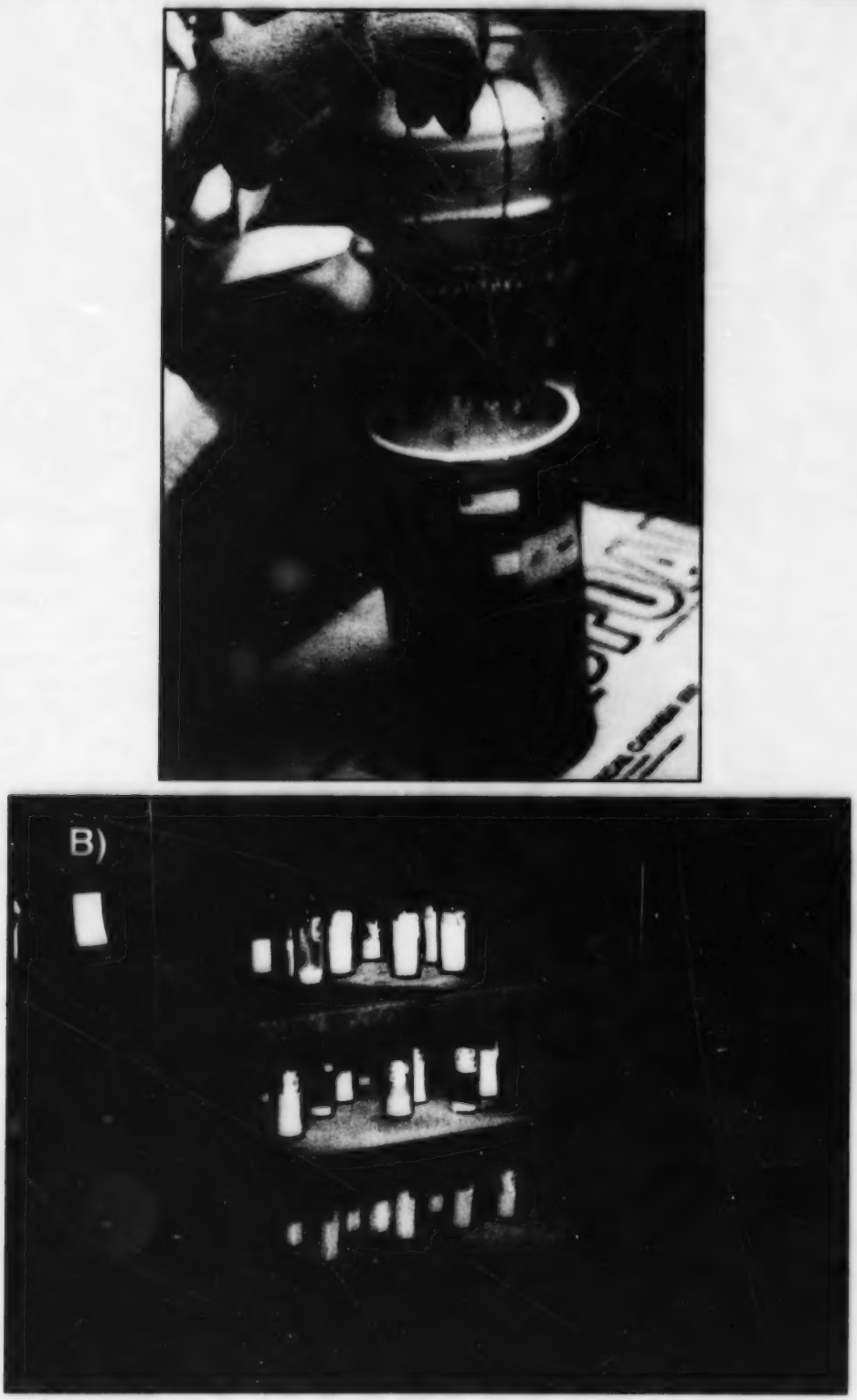

Figure 16. Lyophilisation du pollen ; a) trempage des échantillons dans l'azote liquide (–196 °C) ; b) échantillons de pollen lyophilisés. Lors de la mise sous vide, du pollen peut s'échapper des flacons.

Figure 17. Dépôt des échantillons dans la banque de pollen. Les classeurs sont conservés dans une chambre froide (–30 °C).

2.2.5 Test de germination et mesure de la teneur en eau

On prélève une très faible quantité de pollen (environ 0,05 cm^3) pour la destiner aux tests de germination. Les pollens des arbres feuillus germent particulièrement bien et surtout, rapidement. Cette partie est traitée en détail à la section 3.0. Par ailleurs, la mesure de la teneur en eau est une étape facultative qu'on réalise selon les directives mentionnées à la section 2.1.7.

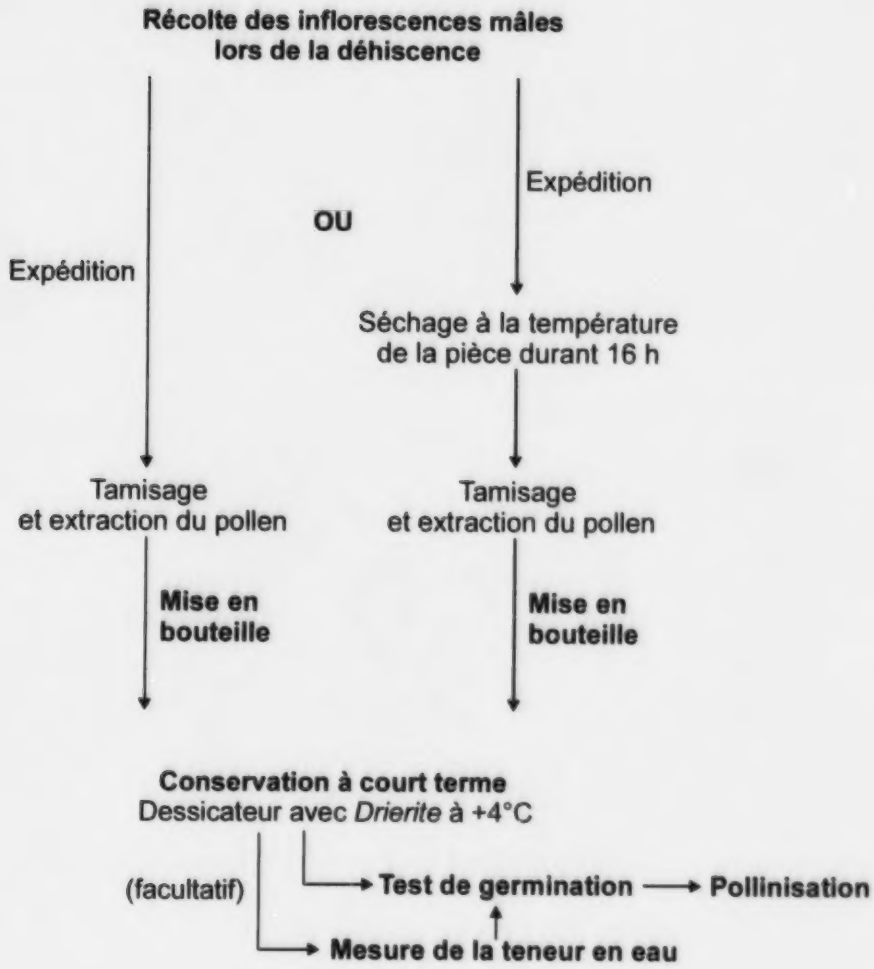

Figure 18. Processus de conservation à court et à long terme du pollen des arbres feuillus.

Chapitre trois

Viabilité du pollen

L'évaluation de la qualité du pollen s'impose avant la réalisation des travaux de pollinisation afin d'assurer la réussite du croisement, pour éliminer les lots ayant de mauvais pourcentages de germination ou qui se sont détériorés lors de la conservation. Cette mesure met en évidence les lots de pollen non viables qui seraient inaptes à des croisements efficaces. La mise au point d'une méthode servant à évaluer la qualité du pollen est donc un outil indispensable à la création d'une banque.

La méthode retenue au MRN pour évaluer la qualité du pollen est le test de germination *in vitro*. Ce type de test consiste à recréer artificiellement les conditions prévalant *in vivo* pour provoquer l'émission d'un tube pollinique. Cette technique donne des résultats fiables bien que surestimant quelque peu la réalité. Elle nécessite cependant beaucoup de manipulations et de soin afin d'éviter les risques de contamination par les champignons. Cette technique exige de quelques heures d'incubation (pour les pollens des espèces feuillues) à trois jours (pour les pollens des espèces résineuses). La presque totalité des pollens des espèces forestières utilisées dans le Programme d'amélioration des arbres germent *in vitro*. Les pollens des mélèzes exigent un test de viabilité ; en effet, le pollen de mélèze s'allonge et n'émet un tube pollinique très court qu'au contact du nucelle (Owens et Molder 1979).

3.1 Tests de germination (milieu solide)

3.1.1 Acclimatation

La germination du pollen sec est influencée par les variations de température auxquelles il est soumis avant le test de viabilité ou avant une pollinisation. Des chocs thermiques où l'écart de température est supérieur à 20 °C réduisent la capacité de germination (Mellerowicz et Bonnet-Masimbert 1983). Une exposition du pollen sec à la température de germination durant 24 heures avant la réalisation des tests peut augmenter jusqu'à 10 % sa capacité de germination. Cet effet n'est évidemment pas comparable à celui de la réhydratation qui rétablit entièrement l'aptitude du pollen à germer. Il est recommandé de procéder à une acclimatation des lots lors de prélèvements des échantillons à partir de la banque de pollen. Cette étape consiste à disposer les lots dans un dessiccateur placé à son tour dans un incubateur maintenu à 4 °C durant 24 heures. Ce type d'acclimatation est particulièrement efficace pour les lots qui ont un faible pouvoir germinatif**.

3.1.2. Réhydratation

Le pollen doit également être réhydraté avant la réalisation des tests de germination, comme le précisent certains auteurs (Charpentier et Bonnet-Masimbert 1983, Mellerowicz et Bonnet-Masimbert 1983, Cerceau-Larrival et Challe 1986, Hoekstra et Van Roekel 1988, Webber et Bonnet-Masimbert 1989, Jett et Frampton 1990). Lors de la déshydratation avant la conservation, le pollen augmente son aptitude à absorber très rapidement une grand quantité d'eau (Mercier 1990). Cette absorption se produit normalement au début de la germination. On peut réaliser un prétraitement du pollen en atmosphère saturée à 25 °C, ce qui assure une première phase de réhydratation lente au cours de laquelle le métabolisme se réactive et les membranes retrouvent leur perméabilité. Durant cette phase, la teneur en eau s'élève progressivement pour atteindre, au bout de quelques heures, une valeur voisine de celle d'un pollen au moment de sa dissémination dans les conditions naturelles. L'introduction de cette phase de réhydratation permet à certains lots conservés de retrouver un pourcentage élevé de germination.

Tableau 8. Description des milieux de culture nécessaires à la germination *in vitro* du pollen pour chaque espèce utilisée dans le Programme d'amélioration génétique des arbres

Espèce	Concentrations (mM)						Jours de culture à 25 °C et à l'obscurité
	H_3BO_3	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	KNO_3	$MgSO_4 \cdot H_2O$	pH	Saccharose	Agar (%)	
Bouleau gris	0,97	1,69	0	0	5,8	438,21	1,0	1
Bouleau à papier	0,97	1,69	0	0	5,8	584,28	1,0	1
Épinette blanche	8,09	1,27	1,0	1,45	5,3	146,07	0,6	2
Épinette de Norvège	8,09	1,27	1,0	1,45	5,3	292,14	0,6	2
Épinette noire	8,09	1,27	1,0	1,45	5,3	146,07	0,6	2
Épinette rouge	8,09	1,27	1,0	1,45	5,3	146,07	0,6	2
Mélèze sp.	8,09	1,27	1,0	1,45	5,3	0	0,6	2
Pin gris	8,09	1,27	1,0	1,45	5,3	146,07	0,6	3
Peuplier baumier	0,97	1,69	0	0	5,8	584,28	0,6	1
Peuplier deltoïde	0,97	1,69	0	0	5,8	584,28	0,6	1

Toutefois, la réhydratation n'est nécessaire que lorsque la teneur en eau est inférieure à 10 %. Ainsi, il n'est pas essentiel de réhydrater le pollen frais qui n'a pas été séché.

3.1.3 Milieu de culture

Le tableau 8 décrit les milieux de culture nécessaires à la germination *in vitro* du pollen de chaque espèce utilisée dans le Programme d'amélioration génétique des arbres. De manière générale, ces milieux correspondent à des adaptations du milieu de Brewbaker et Kwack (1963) pour les pollens des espèces résineuses et du milieu d'Heslop-Harrison (1979a) pour les pollens des espèces feuillues.

Il importe que toutes les opérations soient réalisées dans des conditions strictes de stérilité afin d'éviter les risques de contamination par des champignons. En effet, ceux-ci ont tendance à se développer dans des conditions semblables à celles qu'on retrouve au cours des tests de germination. Toutefois, les pollens des arbres feuillus n'exigent pas de conditions aseptiques* particulières puisqu'ils germent rapidement de sorte qu'aucun champignon n'a le temps de se développer dans un aussi bref délai (Leclerc 1975). Néanmoins, l'application de conditions culturales strictes permet une bonne reproductibilité des résultats et ce, quel que soit l'opérateur qui les effectue.

Les milieux ainsi que toutes les pièces d'équipement servant à la mise en culture du pollen doivent donc être stérilisés à l'autoclave durant 15 minutes à 120 °C (figure 19). Le milieu gélosé est coulé dans des boîtes de Pétri stériles d'un diamètre de 6 cm et l'ensemble est refroidi à la température ambiante sous une hotte à flux laminaire. Une étude réalisée dans notre laboratoire (résultats non présentés) a montré que la quantité de milieu de culture gélosé dans la boîte de Pétri a une influence sur le pourcentage de germination des échantillons. Le pourcentage de germination maximum s'observe avec un volume de milieu de culture de 6 ml. Avec des volumes inférieurs le pourcentage est plus faible ; avec des volumes supérieurs il n'y a pas d'augmentation significative. Aussi le volume de 6 ml a-t-il été retenu pour la réalisation des tests de germination en milieu solide. Une faible quantité de pollen (environ 0,05 cm^3) est saupoudrée à l'aide d'une spatule de manière à le répartir sur l'ensemble de la surface du milieu et, surtout, de façon à ce qu'il n'y ait pas d'agrégats. Seulement deux répétitions sont nécessaires à l'obtention d'une valeur reproductible.

Figure 19. Stérilisation en autoclave des milieux de culture et des instruments servant à l'ensemencement des boites de Pétri.

Le pH du milieu de culture doit idéalement se situer entre 5,5 et 6,25. Toutefois, l'expérience démontre qu'il n'est pas nécessaire d'être particulièrement précis dans l'ajustement du pH puisque les grains de pollen ont tendance à isoler leur environnement immédiat de manière à le rendre favorable à la germination. L'écart ne doit toutefois pas être trop important. Avant ajustement, les deux milieux de culture, celui de BREWBAKER et KWACK et celui de HESLOP-HARRISON, ont un pH compris dans la gamme idéale.

Des antibiotiques ont été utilisés par MUREN *et al.* (1979) ainsi que par MELLEROWICZ et BONNET-MASIMBERT (1983) pour combattre les champignons. À des concentrations inférieures à 90 mg/ml, ces antibiotiques n'ont aucun effet inhibiteur sur la germination du pollen. Toutefois, ils n'ont eu pratiquement aucun effet de répression des champignons au cours des trois jours d'incubation des pollens des arbres résineux. En fait, la meilleure façon de limiter l'action des contaminants demeure le travail en milieu stérile.

Les boîtes de Pétri sont placées à l'envers à l'obscurité dans un incubateur à 25 °C. Le temps d'incubation varie de un à trois jours selon les espèces. Les pollens des espèces feuillues germent très rapidement de sorte qu'il est préférable de mesurer la germination au cours de la même journée afin que le champ de vision du microscope ne soit pas envahi par les tubes polliniques.

Figure 20. Boite de Pétri contenant un milieu de culture gélosé ensemencé avec un échantillon de pollen.

Figure 21. Grains de pollen d'épinette de Norvège avec leur tube pollinique (grossissement 100X).

3.1.4 Détermination du pourcentage de germination

Le dénombrement des grains de pollen germés se fait en plaçant directement la boîte de Pétri sur la platine d'un microscope optique. Le dénombrement des grains germés et non germés se fait généralement à un grossissement de 40 à 100X. Un grain est considéré germé lorsque la longueur du tube pollinique est supérieure à deux fois le diamètre du grain (figure 21). La quantité de pollen observée avec cette technique est plus importante que celle de la culture en goutte pendante (page suivante). Le dénombrement se fait à partir d'un échantillon de taille plus élevée mais le nombre de répétitions est inférieur : deux répétitions pour le milieu solide comparativement à quatre pour le milieu liquide. Le dénombrement peut s'effectuer directement bien que le réactif d'ALEXANDER (1969) puisse être utilisé pour augmenter le contraste (tableau 9). Le tube pollinique et la cellule sporogène* sont alors colorés en rose et l'exine en vert.

Le pourcentage de germination (G) est estimé selon le rapport suivant :

$$G\,(\%) = \frac{\text{nombre de grains germés}}{\text{nombre total de grains}} \times 100 \qquad [2]$$

Tableau 9. Composition du réactif d'ALEXANDER (1969) servant à la coloration des grains de pollen.[1,2] Quantités pour 250 ml de réactif

Produits	Quantité
Alcool éthylique 95 %	10,0 ml
Vert de malachite	1,0 ml
Eau déminéralisée ultra pure	50,0 ml
Glycérol	25,0 ml
Phénol	5,0 g
Trichloro-éthylène glycol	5,0 g
Fuchsine acide (ou rouge d'aniline)	5,0 ml
Orange G 1 %	0,5 ml
Acide acétique concentré	3,0 ml

[1] Ces produits doivent être additionnés dans l'ordre de présentation et mélangés entre chaque addition.
[2] Le réactif doit être conservé dans une bouteille opaque à 4 °C.

La taille de l'échantillon à dénombrer est fonction du pourcentage de germination déterminé. STANLEY et LINSKENS (1974) ont fourni une table qui donne la taille minimale de l'échantillon à observer pour avoir un résultat statistiquement significatif au seuil de 5 % (tableau 10). Après un premier comptage, on obtient un pourcentage de germination donné ; la taille de l'échantillon sur lequel se fait la mesure doit être comparée à celle qui est nécessaire pour obtenir un résultat statistiquement valable ; si elle est égale ou supérieure, le résultat est jugé satisfaisant. Sinon il faut poursuivre le dénombrement jusqu'à l'obtention d'un échantillon de taille suffisante.

Les échantillons présentant un pourcentage de germination inférieur à 20 % sont généralement éliminés.

3.2 Tests de viabilité (milieu liquide)

Le test de germination *in vitro* est vraisemblablement l'une des méthodes les plus fiables pour évaluer la qualité du pollen et c'est pour cette raison qu'il a été mis au point pour chacune des espèces retenues dans le programme. Toutefois, il convient de rappeler que chez les mélèzes, il n'y a individualisation d'un tube pollinique — d'ailleurs très court — qu'au contact du nucelle (CHARPENTIER et BONNET-MASSIMBERT 1983). La germination du pollen des mélèzes ressemble à celle du pollen du douglas qui est très difficile à faire germer *in vitro* (BONNET-MASIMBERT 1992).

Tableau 10. Table de STANLEY et LINSKENS (1974) indiquant la taille de l'échantillon à dénombrer pour obtenir un pourcentage de germination du pollen qui soit statistiquement valable au seuil de 5 %

Pourcentage de germination (%)	Nombre de grains à compter
1 ou 99	15
5 ou 95	73
10 ou 90	138
15 ou 85	196
20 ou 80	246
25 ou 75	288
30 ou 70	323
35 ou 65	350
40 ou 60	369
45 ou 55	380
50	384

On peut cependant estimer la viabilité du pollen de mélèze en l'incubant dans une solution nutritive (milieu de Brewbaker et Kwack 1963) durant deux jours selon la technique de la goutte pendante (figure 22).

La technique de la goutte pendante consiste à introduire une faible quantité de milieu dans une chambre de culture (puits de test *ELISA*). Le pollen est par la suite déposé et la chambre de culture est renversée. La taille réduite de la chambre de culture et le faible volume de liquide font en sorte que le contenu demeure dans le puits malgré l'effet de la gravité. Le renversement de la chambre fait en sorte que le pollen demeure à la surface de la goutte au lieu de sédimenter au fond du puits. Ainsi, les grains de pollen disposent de tout l'oxygène nécessaire aux mécanismes biochimiques intervenant dans la différenciation des cellules spermatiques.

Il est indispensable de réaliser au moins quatre répétitions de ce test afin d'obtenir un résultat statistiquement fiable. À l'inverse du test de germination *in vitro* où on peut dénombrer directement les pollens viables à partir du milieu de culture, la technique de la goutte pendante exige qu'un échantillon représentatif soit prélevé pour une observation sous le microscope optique. Pour ce faire, l'échantillon doit préalablement être homogénéisé avant de prélever un aliquote qui sera déposé entre lame et lamelle. Le dénombrement des grains viables et non viables se fait généralement sous un grossissement de 100X. Le dénombrement peut s'effectuer directement bien qu'on puisse encore une fois utiliser le réactif d'Alexander (1969) pour augmenter le contraste (tableau 9). La cellule sporogène est alors colorée en rose et l'exine en vert. L'évaluation du pourcentage de viabilité est déterminée selon les modalités et l'équation [2] (qui sont présentées à la section 3.1.4). Les échantillons présentant un pourcentage de viabilité inférieur à 20 % sont généralement éliminés.

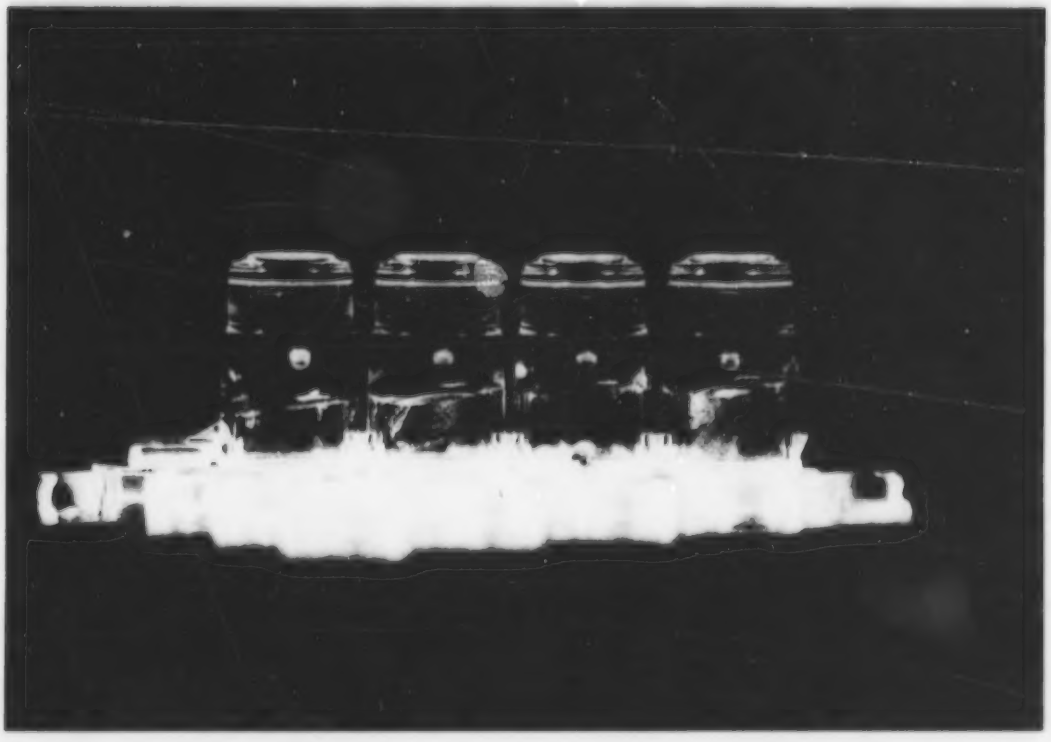

Figure 22. Technique de la goutte pendante.

Conclusion générale

La création d'une banque de pollen permet la conservation des ressources génétiques. La nécessité d'une banque de ce genre dans le Programme d'amélioration des arbres n'est plus à démontrer. Les demandes chaque année grandissantes et l'avènement prochain des vergers à graines de deuxième génération en justifient l'existence. Par ailleurs, avec le contrôle de la déshydratation et l'introduction de la cryogénie, les méthodes de conservation ont progressé significativement. La durée et la fiabilité du stockage se sont également améliorées.

Les tests de germination ont été mis au point pour les pollens des espèces les plus en demande dans le programme. Seul le pollen des mélèzes ne répond pas aux tests de germination et c'est pour cette raison que nous devons utiliser un test de viabilité pour estimer la qualité de ce pollen.

Par ailleurs, la conservation à grande échelle du pollen des arbres résineux apparaît adéquate puisqu'il est possible de maintenir leur viabilité durant une période minimale de cinq ans. Le développement de la pollinisation de masse dans les vergers à graines de 2e génération va entraîner le traitement de lots de pollen de gros volume. Une technique de conservation de lots de 500 ml à 1 litre devra être développée afin de faciliter les opérations d'entreposage. Il reste encore beaucoup à apprendre au sujet de la conservation des pollens des arbres feuillus. C'est d'ailleurs dans cette voie que seront axés les efforts de recherche et de développement des prochaines années.

Glossaire [1]

Anémophile : adj. Espèce végétale dont la dissémination du pollen est assurée par le vent. [*anemophilous, wind-pollinated*]

Anthèse : n.f. (gr. *anthêsis*, floraison). Période de développement des fleurs où le pollen est disséminé et l'ovule est réceptif. Syn. : épanouissement, flossification, *sponsalia plantarum*. [*anthesis, blooming, blossoming*]

Aseptique : adj. Qui est exempt de tout microbe. [*aseptic*]

Banque de pollen : n.f. Collection de pollen vivant conservé dans le but, entre autres, de réaliser des pollinisations dirigées. [*pollen bank*]

Cellule gamétogène : n.f. Chez les gymnospermes et chez certains angiospermes primitifs, cellule qui donnera naissance à une cellule-socle stérile et à une cellule spermatogène [*gametogenous cell*]

Cellule spermatogène : n.f. Chez les gymnospermes et chez certains angiospermes primitifs, cellule issue de la cellule gamétogène du grain de pollen et qui donnera naissance aux deux gamètes mâles. [*generative cell*]

Cellule sporogène : n.f. Cellule provenant de l'hypoderme du microsporange (sac pollinique*) et qui produit les cellules-mères du pollen. [*sporogenous cell*]

Conservation à court terme : n.f. Conservation de l'ordre de quelques jours à quelques semaines. [*short-term stocking*]

Conservation à long terme : n.f. Conservation de plusieurs années (en théorie, limite indéfinie). [*long-term stocking*]

Croisement dirigé : n.m. Croisement entre deux individus réalisé par l'intermédiaire de l'homme, par opposition au croisement libre ou par le vent. [*controlled cross*]

Cryogénie : n.f. Technique qui consiste à conserver des tissus vivants ou morts à de très basses températures (en général -196 °C). Les banques de pollen, entre autres, utilisent la cryogénie pour conserver les lots de pollen. [*cryopreservation*]

Déhiscence : n.f. Manière dont un organe clos se fend à maturité pour libérer son contenu comme une capsule qui libère les graines ou une anthère qui libère du pollen. [*dehiscence*]

---

[1] Tiré de Mercier et Tousignant 2000.

Dissémination : n.f. Acte par lequel les graines mûres ou le pollen sont dispersés à la surface de la terre ou des eaux. [*dissemination, dispersion, scattering*]

Eau de constitution : n.f. L'eau de constitution d'une cellule correspond à l'eau qui est liée aux macromolécules la constituant ou présentes dans la cellule (par opposition à l'eau libre). [*bound water*]

Eau libre : n.f. Molécule d'eau présente dans une cellule sans être liée à d'autres molécules. [*free water*]

Entomophile : adj. Espèce végétale dont la dissémination du pollen est assurée par les insectes. [*entomophilous, insect-pollinated*]

Exine : n.f. Couche externe de la paroi squelettique du grain de pollen. Chez les Gymnospermes, l'exine se décolle de l'intine en formant deux ballonnets latéraux, remplis d'air, qui faciliteront le transport aérien du pollen sur de grandes distances. L'exine possède des pores germinatifs. C'est par l'un deux que l'intine se distendra considérablement lors de la germination du pollen à la surface des pièces femelles de la fleur. [*exine*]

Fertilité : n.f. **1.** Capacité à produire un taux normal de graines après une pollinisation dirigée (Binder *et al*. 1975). **2.** Capacité à promouvoir la formation de graines pleines (Copes 1987). [*fertility*]

Intine : n.f. Couche interne pecto-cellulosique de la paroi squelettique du grain de pollen. C'est elle qui se distend lorsque germe le grain de pollen à la surface des pièces femelles de la fleur, constituant alors le tube pollinique, et va conduire à domicile les gamètes mâles dans le processus de siphonogamie. [*intine*]

Maturité : n.f. État de ce qui est mûr, c'est-à-dire parvenu à son complet développement. [*maturity*]

Parc à clones : n.m. Collection d'arbres d'élite, ou d'arbres plus, constituée en vue de son utilisation pour des travaux de génétique ou d'amélioration génétique des arbres.

Phylogénétique : n.f. Branche de la génétique traitant des modifications d'ordre génétique qui se produisent au sein d'une espèce, végétale ou animale, au cours de l'évolution.

Plasmalemme : n.m. Membrane qui limite toute cellule. [*plasmic membrane, plasma membrane*]

Pollen : n.m. Production microscopique libérée par les anthères des étamines à la faveur de processus variés de déhiscence. Peu de temps avant le début de la floraison, les organes reproducteurs mâles, comme les organes femelles des sporophytes, sont le siège de la réduction chromatique. Les cellules-mères de microspores, à 2n chromosomes, subissent lors de la méiose deux divisions successives (hétérotypique et homéotypique) qui donneront naissance à quatre microspores haploïdes groupées initialement en tétrade : les tétraspores. Le stade tétrade est le début de la vie indépendante des microspores et le moment où commence l'élaboration de leur paroi. Les microspores sont libérées par la dissolution de la paroi de la tétrade pour donner des grains de pollen. À maturité, le grain de pollen se présente sous forme plus ou moins sphérique. Il est entouré d'une paroi pollinique, composée de deux parties : l'intine et l'exine. [*pollen, anther dust*]

Pollinisation dirigée : n.f. Voir : croisement dirigé. [*controlled pollination*]

Pouvoir germinatif : n.m. Capacité à produire des tubes polliniques dans des conditions optimisées de croissance *in vitro* (Binder *et al.* 1975). [*germinability*]

Protandrie : n.f. Dispersion du pollen mûr avant que les fleurs femelles, ou la partie femelle des fleurs, soient réceptives sur la même plante. Ce mode de floraison empêche ou limite considérablement l'autofécondation. Ant. : protogynie, protérogynie. [*protandry, proterandry*]

Protogynie : n.f. Dispersion du pollen mature alors que les fleurs femelles ont cessé d'être réceptives sur le même arbre. Ce mode de floraison empêche ou limite considérablement l'autofécondation. Ant. : protandrie, protérandrie. [*protogyny, proterogyny*]

Pseudoplasmolyse : n.f. État physiologique cellulaire ressemblant à une plasmolyse, c'est-à-dire une perte d'eau cellulaire, par phénomène d'osmose, due au placement de la cellule dans un milieu hypertonique.

Qualité : n.f. Combinaison de la viabilité et de la vigueur (Moody et Jett 1990). [*quality*]

Réceptivité : n.f. État de la fleur femelle qui permet l'entrée et la progression du pollen. [*receptivity*]

Sac pollinique : n.m. Au niveau de l'anthère d'une étamine, on appelle sac pollinique chacun des massifs de cellules-mères de grains de pollen au niveau desquels se réalisera la méiose. En principe, il en existe deux par microsporophylle de Gymnosperme, et quatre par étamine d'Angiosperme. Syn. : microsporange. [*pollen sac*]

Test de descendances : n.m. Test qui permet d'apprécier la constitution génétique d'un individu d'après les caractéristiques de sa descendance, obtenue par un procédé de reproduction déterminé.

Test de germination : n.m. Test réalisé sur des graines ou des pollens qui suivent le développement du semis ou du tube pollinique pour indiquer le pourcentage de germination potentiel d'un lot de graines ou de pollen. [*germination test*]

Test de provenances : n.m. Test de descendances appliqué à des populations appartenant à la même espèce, mais de provenances différentes, en vue de : 1) étudier leurs performances dans différentes conditions de milieu ; 2) déterminer la distribution de certains caractères de la descendance en fonction de la provenance ; 3) identifier les provenances les meilleures en vue d'une utilisation sylvicole donnée ; 4) établir une collection de biotypes de valeur immédiate ou potentielle pour améliorer l'espèce.

Test de viabilité : n.m. Test réalisé sur des graines ou des pollens afin de déterminer le pourcentage de viabilité d'un lot de graines ou de pollen. Ce type de test a tendance à surestimer les résultats du test de germination puisqu'un grain de pollen viable n'est pas nécessairement apte à la germination. [*viability test*]

Tube pollinique : n.m. Excroissance d'un grain de pollen germé à travers laquelle le nucléole génératif passe pour effectuer la fécondation. C'est le prolongement en tube du grain de pollen, lorsque ce dernier se trouve dans les conditions favorables à son développement ; la longueur qu'atteint ainsi le tube pollinique peut être de mille fois celle du grain de pollen. [*pollen tube, pollinic tube, germ tube*]

Verger à graines : n.m. Plantation d'arbres génétiquement supérieurs au regard d'un ou plusieurs critères donnés, et isolée de façon à réduire le risque de pollinisation à partir de sources étrangères. Les arbres y sont traités de façon à produire fréquemment et en abondance des semences faciles à récolter.

Viabilité : n.f. Capacité d'une graine ou d'un grain de pollen à germer. C'est l'aptitude d'une graine (ou d'un grain de pollen) à vivre, c'est-à-dire à germer et à se développer dans des conditions de milieu normales. Voir : test de viabilité. [*viability*]

Vigueur : n.f. **1**. Capacité à former des graines pleines (Bramlett et Matthews 1991). **2**. Capacité à germer, à se développer *in vitro* et à féconder (Moody et Jett 1990). [*vigor*]

Références

ABID, A., 1991. *Contribution à l'étude de la pollinisation de l'olivier (*Olea europaea *L.) et du clémentinier (*Citrus reticulata *Blanco). Utilisation des données polliniques comme indice prévisionnel des récoltes à l'échelle locale et régionale*. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II. 146 p.

AHLGREN, C.E. et I.F. AHLGREN, 1978. *Viability and fertility of vacuum dried pollen of 5 needle pine species*. Forest. Sci. 24(1) : 100-102.

AHUIA, M.R., 1986. *Storage of forest tree germplasm in liquid nitrogen (-196 °C)*. Silvae Genet. 35(5-6) : 249-251.

AIZEN, M.A. et A.E. ROVERE, 1995. *Does pollen viability decrease with aging? A cross-population examination in* Austrodedrus chilensis *(Cupressaceae)*. Int. J. Plant Sci. 156(2) : 227-231.

ALAMI, S., A. SOUVRE et L. ALBERTINI, 1988. *The effects of stresses (cold or/and darkness) on pollen viability of two varieties of grain-Sorghum*. Dans : M. Cresti, P. Gori et E. Pacini (éd.). Sexual reproduction in higher plants. Proc. of the 10th Intl. Symp. on the Sexual Reproduction in Higher Plants, 30 mai-4 juin, Sienne (Italie). Springer-Verlag, New-York : 259-264.

ALEXANDER, M.P., 1969. *Differential staining of aborted and non aborted pollen*. Stain Technol. 44 : 117-122.

ARÈS, A. et J. MARCOUX, 1971. *Structure de la matière*. Éd. Lidec Inc. Montréal. 482 p.

ASBECK, F., 1954. *Sonnenlicht und biogenese*. Strahlentherapie 93(1) : 602-609.

AURIOL, C., 1992. *La diversité biologique. La vie en péril*. Société pour la protection de l'environnement. Coll. « Dossiers de l'environnement », vol. VII. Éd. Georg. 135 p.

BAJAJ, Y.P.S., 1987. *Cryopreservation of pollen and pollen embryos, and the establishment of pollen banks*. Intl. Rev. Cytol. 107 : 397-420.

BARNABÁS, B., 1985. *Effect of water loss on germination ability of maize (*Zea mays *L.) pollen*. Ann. Bot. 55 : 201-204.

BECWAR, M.R., P.C. STANWOOD et K.W. LEONHARDT, 1983. *Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of dessication-tolerant and dessication-sensitive seeds*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108(4) : 613-618.

BINDER, W.D. et D.J. BALLANTYNE, 1975. *The respiration and fertility of* Pseudotsuga menziesii *(Douglas fir) pollen*. Can. J. Bot. 53 : 819-823.

BINDER, W.D., G.M. MITCHELL et D.J. BALLANTYNE, 1974. *Pollen viability, testing, storage, and related physiology. Review of the literature with emphasis on gymnosperm pollen*. Dept. Environ., Can. Forest Serv., Pacific Forest Res., Information Report BC-X-105. 37 p.

BINGHAM, W.E., S.L. KRUGMAN et E.F. ESTERMANN, 1964. *Acrylamide electrophoresis of pine pollen proteins*. Nature 202 : 125-143.

BONNET-MASIMBERT, M., 1984. *Biologie florale et cycle de reproduction de quelques arbres forestiers. douglas, pin sylvestre, chêne*. Dans : P. Person et J. Louvreaux. Pollinisation et reproductions végétales. I.N.R.A., Paris : 219-242.

BONNET-MASIMBERT, M., 1992. [Communication personnelle]. Institut national de Recherches agronomiques d'Orléans (France).

BONNET-MASIMBERT, M. et J.E. WEBBER, 1995. *From flower induction to seed production in forest tree orchards*. Tree Physiology 15 : 419-426.

BONNET-MASIMBERT, M., P. BALDET, L.E. PÂQUES et G. PHILIPPE, 1997. *From flowering to artificial pollination in larch for breeding and seed orchard production*. The Forestry Chronicle 74(2) : 195-202.

BRAMLETT, D.L. et F.R. MATTHEWS, 1991. *Storing loblolly pine pollen*. South. J. Appl. For. 15(3) : 153-157.

BREWBAKER, J.L. et B.H. KWACK, 1963. *The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth*. Amer. J. Bot. 50(9) : 859-865.

BRINK, R.A., 1924. *The physiology of pollen*. Amer. J. Bot. 11 : 283-294.

BROOKS, J. et G. SHAW, 1978. *Sporopellenin : a review of its chemistry, palaeochemistry and geochemistry*. Grana 17(2) : 91-97.

BURDON, R.D. et C.B. LOW, 1973. *Seed production of* Pinus radiata *clones on four different sites*. N. Z. J. For. Sci. 3 : 211-219.

CALLEN, G. et M.-T. CERCEAU, 1992. *Conservation des ressources génétiques végétales*. Programme pluriformation regroupant le service des cultures et le laboratoire de palynologie, Paris. 25 p.

CAUNEAU-PIGOT, A., 1988. *Biopalynological study of* Lapageria rosea *Ruiz & Pav. and* Iris lunguicularis *Poir. Storage of pollen*. Grana 27 : 297-312.

CELA RENZONI, G., L. VIEGI, A. STEFANI et A. ONNIS, 1990. *Different* in vitro *germination responses in* Pinus pinea *pollen from two localities with different levels of pollution*. Ann. Bot. Fennici 27 : 85-90.

CELA RENZONI, G. et L. VIEGI, 1991. In vitro *sensitivity of* Pinus pinaster *and* P. pinea *pollen grains to different pH values*. Ann. Bot. Fennici. 28 : 135-142.

CERCEAU-LARRIVAL, M.-T., 1987. *Le patrimoine génétique des collections végétales vivantes du Muséum vu à travers le pollen*. Société des amis du Muséum national d'Histoire naturelle et du Jardin des plantes, feuille d'information de décembre. 6 p.

CERCEAU-LARRIVAL, M.-T., 1990. *Le pollen : gamétophyte mâle*. Bull. Soc. Bot. Fr. 137(2) : 7-30.

CERCEAU-LARRIVAL, M.-T., 1992. [Communication personnelle]. Muséum national d'Histoire naturelle, Laboratoire de Palynologie, Paris.

CERCEAU-LARRIVAL, M.-T. et J. CHALLE, 1986. *Biopalynology and maintenance of germination capacity of stored pollen in some angiosperm families*. Dans : S. Blackmore et K. Ferguson (éd.). Pollen and Spores : form and function. Linnean Society Symposium Series, 12. Academic Press : 151-164.

Cerceau-Larrival, M.-T. et M. Hideux, 1986. *Voyageuses du temps et de l'espace, les capsules à pollen.* L'Univers du vivant 13 : 14-15.

Charpentier, J.-P. et M. Bonnet-Masimbert, 1983. *Influence d'une réhydratation préalable sur la germination in vitro du pollen de douglas (Pseudotsuga menziesii) après conservation.* Ann. Sci. For. 40(3) : 309-317.

Charrier, A., 1990. *Pollen et ressources génétiques.* Bull. Soc. Bot. Fr., 137(2) : 101-104.

Chhabra, N. et C.P. Malik, 1978. *Influence of spectral quality of light on pollen tube elongation in Arachis hypogaea.* Ann. Bot. 42 : 1109-1117.

Ching, T.M. et K.K. Ching, 1964. *Freeze-drying pine pollen.* Plant Physiol. 39 : 705-709.

Ching, T.M. et K.K. Ching, 1976. *Rapid viability tests and aging study of some coniferous pollen.* Can. J. For. Res. 6 : 516-522.

Ching, T.M., M.W. Ranzoni et K.K. Ching, 1975. *ATP content and pollen germinability of some conifers.* Plant Sc. Lett. 4 : 331-333.

Christiansen, H., 1969. *On the germination of pollen of Larix and Pseudotsuga on artificial substrate, and on viability tests of pollen of coniferous trees.* Silvae Genet. 18 : 104-107.

Colas, F., 1992. *Influence de la teneur en eau dans la détermination et le maintien de la viabilité du pollen d'arbres forestiers.* Ministère des Forêts, Direction de la recherche, Rapport interne n° 345. 82 p.

Colas, F. et S. Mercier, 1994a. *Conservation à court terme et évaluation du taux de germination du pollen de bouleau gris et de bouleau à papier.* Ministère des Ressources naturelles, Direction de la recherche forestière. Rapport interne n° 378. 35 p.

Colas, F. et S. Mercier, 1994b. *Établissement d'une gamme de viabilité du pollen de pin gris.* Ministère des Ressources naturelles, Direction de la recherche forestière, Note de recherche forestière n° 58. 7 p.

Cook, S.A. et R.G. Stanley, 1960. *Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability.* Silvae genet. 9 : 134-136.

Copes, D.L., 1985. *Fertility of Douglas-fir pollen after one year of storage in liquid nitrogen.* For. Sci. 31(3) : 569-574.

Copes, D.L., 1987. *Long-term storage of Douglas-fir pollen.* For. Sci. 33 : 244-246.

Copis, P.L., 1990. *Pollination techniques. I. Pollen collection.* Forestry Canada, PNFI. Technical Report No. 4. 4 p.

Cox, R.M., 1988. *The sensitivity of pollen from various coniferous and broad-leaved trees to combinations of acidity and trace metals.* New Phytol. 109 : 193-201.

Cram, W.H. et C.H. Lindquist, 1984. *Pollen viability studies for Picea pungens.* For. Chron. avril : 93-95.

Crane, P.R., 1986. *Form and function in wind dispersed pollen.* Dans : S. Blackmore et K. Ferguson (éd.), Pollen and Spores : form and function. Linnean Society Symposium Series, 12. Academic Press : 179-202.

Davies, M.D. et D.B. Dickinson, 1971. *Effects of freeze-drying on permeability and respiration of germinating Lily pollen.* Physiol. Plant. 24 : 5-9.

Denison, N.P. et E.C. Franklin, 1975. *Pollen management.* Forestry Commission Bulletin No. 54 : Seed orchards. Éd. Faulkner. London : 92-100.

Delvallée, I., J. Guillaud, M. Beckert et C. Dumas, 1989. *Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and in vitro.* Plant Sci. 60 : 129-136.

Digonnet-Kerhoas, C. et G. Gay, 1990. *Qualité du pollen : définition et estimation.* Bull. Soc. Bot. Fr. 137(2) : 97-105.

Dogra, P.D., 1967. *Seed sterility and disturbances in embryogeny in conifers with particular reference to seed testing and tree breeding in Pinaceae.* Stud. For. Suec. 45 : 1-97.

Dowding, P., 1987. *Wind pollination mechanisms and aerobiology.* Internat. Rev. Cyt. 107 : 421-437.

Duffield, J.W., 1954. *Studies of extraction, storage and testing of pine pollen.* Z. Forstgenetik 3 : 39-45.

Duffield, J.W. et A.G. Snow, 1941. *Pollen longevity of Pinus strobus and Pinus resinosa as controlled by humidity and temperature*. Amer. J. Bot. 28 : 175-177.

Dumas, C., J.C. Duplan, T. Gaude et C. Said, 1983. *¹H Nuclear Magnetic Resonance to correlate water content and pollen viability*. Dans : D.L. Mulcahy et E. Ottaviano (éd.). Pollen : biology and implications for plant breeding. Elsevier Science Publ. Co. : 15-20.

Dumas, C., R.B. Knox et T. Gaude, 1984. *Pollen-pistil recognition and pollen hydration*. Phytomorphol. 341 : 191-201.

Dumas, C., C. Kerhoas, G. Gay et T. Gaude, 1986. *Water content, membrane state and pollen physiology*. Dans : D.L. Mulcahy et E. Ottaviano (éd.). Biotechnology and Ecology of Pollen. Proc. Intl. Conf. Biotechnology and Ecology of pollen, 9-11 juillet 1985, Amherst, N.H. Springer-Verlag, New-York : 333-337.

Egea, J., L. Burgos, N. Zoroa et L. Egea, 1992. *Influence of temperature on the in vitro germination of pollen of apricot (Prunus armeniaca L.)*. J. Hort. Sc. 67(2) : 247-250.

Engelmann, F. et C. Baubault, 1986. *La cryoconservation des embryons somatiques, polliniques et zygotiques*. Bull. Soc. Bot. Fr. 133(3) : 89-103.

Folch, E., 1993. *Influence of relative humidity and temperature on storage of Alnus cordata pollen*. Can. J. For. Res. 23 : 21-24.

Farcy, E., A.M. Vorvalle, A. Cornu et M.-T. Cerceau-Larrival, 1990. *Étude de la conservation du pollen de Petunia : méthodologie, tests de viabilité (in vitro et in vivo) et de conformité génétique*. Bull. Soc. Bot. Fr., 137(2) : 105-110.

Fernandez-Escobar, R., G. Gomez-Valledor et L. Rallo, 1983. *Influence of pistil extract and temperature on in vitro pollen germination and pollen tube growth of olive cultivars*. J. Hort. Sci. 58(2) : 219-227.

Ferrand, J.C., 1988. *Electric heating units pollination bags avoid damage to flowers by spring frost*. Ann. Sci. For. 45 : 157-160.

Flint, S.D. et M.M. Caldwell, 1984. *Partial inhibition of in vitro pollen germination by simulated solar ultraviolet-B radiation*. Ecology 65 : 792-795.

Foster, G.S. et F. Bridgwater, 1979. *Viability tests to evaluate pollen reliability in loblolly pine controlled pollinations*. Forest Sci. 25(2) : 270-274.

Gilissen, L.J.W., 1977. *The influence of relative humidity on the swelling of pollen grains* in vitro. Planta 137 : 299-301.

Griggs, W.H., H.I. Forde, B.T. Iwakiri et R.N. Asay, 1971. *Effect of subfreezing temperature on the viability of Persian walnut pollen*. Hort Science 6(3) : 235-237.

Hagman, M., 1975. *Incompatibility in forest trees*. Proc. R. Soc. Long. B. 188 : 313-326.

Hauser, J.P. et J.H. Morrison, 1964. *The cytochemical reduction of nitroblue tetrazolium as an index of pollen viability*. Am. J. Bot. 51 : 748-752.

Helmer, J.D., J.C. Delouche et M. Lienhard, 1962. *Some indices of vigour and deterioration in seeds of Crimson clover*. Proc. Ass. Off. Seed Anal. 52 : 154.

Hermann, S. 1969. *Practical method to conserve pollen of forest trees under vacuum*. (Pap.) 2nd FAO IUFRO World Consult. for Tree Breed., Wash. No. FO:FTB-69-11/10. 7 p.

Heslop-Harrison, J., 1979a. *Aspects of structure cytochemistry and germination of the pollen of rye (Secale cereale L.)*. Ann. Bot. 44 : 2-65.

Heslop-Harrison, J., 1979b. *An interpretation of the hydrodynamics of pollen*. Am. J. Bot. 66(6) : 737-743.

Heslop-Harrison, J., 1987. *Pollen germination and pollen tube growth*. Internat. Rev. Cytol. 107 : 1-78.

Heslop-Harrison, J. et Y. Heslop-Harrison, 1970. *Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence ; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate*. Stain Technol. 45 : 115-120.

Hill, R. et P. Cope, 1988. *Pollen collecting*. Dans : News Bulletin, CTIA - Tree Seed Working Group No. 10 : 2.

Hoekstra, F.A., 1979. *Mitochondrial development and activity of binucleate and trinucleate pollen during germination in vitro*. Planta 145 : 25-36.

Hoekstra, F.A. et J. Bruinsma, 1975. *Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen*. Physiol. Plant. 34 : 221-225.

HOEKSTRA, F.A. et J. BRUINSMA, 1978. *Reduced independence of the male gametophyte in angiosperm evolution*. Ann. Bot. 42 : 759-762.

HOEKSTRA, F.A. et J. BRUINSMA, 1980. *Control of respiration of binucleate and trinucleate pollen under humid conditions*. Physiol. Plant. 48 : 71-77.

HOEKSTRA, F.A. et T. VAN ROEKEL, 1988. *Desiccation tolerance of Papaver dubium L. pollen during its development in the anther*. Plant physiol. 88 : 626-632.

HOEKSTRA, F.A., T. VAN ROEKEL et N. TEN PAS, 1988. *Pollen maturation and desiccation tolerance*. Dans : M. Cresti, P. Gori et E. Pacini (éd.). Sexual reproduction in higher plants. Proc. 10th Intl. Symp. on the Sexual Reproduction in Higher Plants, 30 mai-4 juin 1988, Sienne (Italie). Springer-Verlag, New-York : 291-296.

HONG-QI, Z., A.F. CROES et H.F. LINSKENS, 1982. *Protein synthesis in germinating pollen of Petunia : role of proline*. Planta 154 : 199-203.

HUGHES, H.G. et C.W. LEE, 1991. *Low-temperature preservation of Clianthus formosus pollen*. HortSci. 26(11) : 1411-1412.

HUGHES, R.N. et R.M. COX, 1993. *In vitro pollen responses of two birch species to acidity and temperature*. J. Environ. Qual. 22 : 799-804.

ICHIBARA, S. et T. SHIDEI, 1971. *Fundamental studies on deep-freezing storage of tree pollen*. Kyoto Univ. For. Bull. 42 : 51-62.

IMAMURA, Y., 1972. *Viability of pollen grains in organic solvents*. J. Sci. 3 : 61-68.

JAIN, A. et K.R. SHIVANNA, 1988. *Storage of pollen grains in organic solvents : effect of solvents on pollen viability and membrane integrity*. J. Plant Physiol. 132 : 499-501.

JAIN, A. et K.R. SHIVANNA, 1989. *Loss of viability during storage is associated with changes in membrane phospholipid*. Phytochemistry 28(4) : 999-1002.

JAIN, A. et K.R. SHIVANNA, 1990. *Storage of pollen grains of Crotalia retusa in situ*. Sex. Plant. Reprod. 3(4) : 225-227.

JANSSONN, A.M.B. et J.G.T. HAWKES, 1976. *Estimating pollen fertility in Solanum species and haploids*. Euphytica 25 : 277-283.

JENSEN, C.J., 1970. *Some factors influencing survival of pollen on storage procedures*. Proc. IUFRO Working Group on the Sexual Reproduction of Forest Trees, Varparanta, Finland : 3-18.

JETT, J.B. et L.J. FRAMPTON, 1990. *Effect of rehydration on in vitro germination of loblolly pine pollen*. South. J. App. For. 14(1) : 48-51.

JOHNSON, L.P.V., 1943. *Storage and artificial germination of forest tree pollen*. Can. J. For. Res. 21 : 332-342.

JØRGENSEN, J., 1990. *Conservation of valuable gene resources by cryopreservation in some forest tree species*. J. Plant Physiol. 136 : 373-376.

KÄPYLÄ, M., 1991. *Testing the age and viability of airborne pollen*. Grana 29 : 430-433.

KEARNS, C.A. et D.W. INOUYE, 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado. 583 p.

KING, J.R., 1961. *The freeze-drying of pollens*. Econ. Bot. 15 : 91-96.

KING, J.R., 1965. *The storage of pollen, particularly by the freeze-drying method*. Bull. Torrey Bot. Club 92 : 270-287.

KLIEBAN, F.U. et R.L. NEU, 1960. *Hardwood pollen study*. Silvae Genet. 9 : 44-49.

KLINKOWSKI, E.J., 1968. *Genetic load and its causes in long-lived plants*. Trees 2 : 195-203.

KOOPOWITZ, H. et H. KAYE, 1983. *Plant extinction, a global crisis*. Stone Wall Press, Washington. 239 p.

KORMUTAK, A., J. SKALAY et B. VOZKOVA, 1994. *Pollen viability and seed set of silver fir (Abies alba Mill.) in polluted areas of Slovakia*. Silv. Genet. 43(2-3) : 69-73.

KOSMAN, G., 1987. *Empty seed production in European larch (Larix decidua)*. For. Ecol. Manage. 19 : 241-248.

LA PORTA, N. et G. ROSSELLI, 1991. *Relationship between pollen germination in vitro and fluorochromatic reaction in cherry clone F 12/1 (Prunus avium L.) and some of its mutants*. J. Hort. Sci. 66(2) : 171-175.

Lamontagne, Y., 1992. *Vergers à graines de première génération et tests de descendances implantés au Québec pour les espèces résineuses. Bilan des réalisations*. Ministère des Forêts, Direction de la recherche, Mémoire de recherche forestière n° 106. 36 p.

Lanner, R.M., 1962. *Controlling the moisture content of conifer pollen*. Silvae Genet. 11 : 114-117.

Lanteri, S., P. Belletti et S. Lotito, 1993. *Storage of pollen of Norway spruce and different pine species*. Silv. Genet. 42 (2-3) : 104-109.

Leclerc, H., 1975. *Microbiologie générale*. Édition Douin, Paris. 279 p.

Leigh, F.T., 1986. *Heterozygosity, heterosis, and fitness in outbreeding plants*. Dans : M.E. Soule, éd. Conservation biology : the science of scarcity and diversity. Sinauer, Surderland, Mass : 77-104.

Lewis, R.A., 1987. *Biochemical gene markers*. Dans : E.C. Franklin, éd. *Pollen management handbook*. USDA Forest Serv., Agric. Handbook No. 87 : 58-61.

Lin, J.J. et D.B. Dickinson, 1984. *Ability of pollen to germinate prior to anthesis and effect of desiccation on germination*. Plant Physiol. 74 : 748-748.

Livingston, G.K. et K.K. Ching, 1967. *The longevity and fertility of freeze-dried Douglas-fir pollen*. Silvae Genet. 16 : 99-104.

Luza, J.G., V.S. Polito, 1985. *In vitro germination and storage of English walnut pollen*. Sci. Hort. 27 : 303-316.

Luza, J.G., V.S. Polito, 1987. *Effects of desiccation and controlled rehydration on germination in vitro of pollen of Walnut (Juglans spp)*. Plant Cell and Environment 10 : 487-492.

Lyons, L.A., 1956. *The seed production capacity and efficiency of red pine cones (Pinus resinosa)*. Can. J. Bot. 34 : 27-36.

Mahan, M.P. et J.W. Shive, 1941. *Boron as a factor in the calcium metabolism of the corn plant*. Soil Sci. 51 : 141-191.

Martin, F.W., 1959. *Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence*. Stain Technol. 34 : 125-128.

Mazur, P., 1966. *Physical and chemical basis of injury in single celled and microorganisms subjected to freezing and thawing*. Dans : H. Merryman (éd.). Cryobiology. Academic Press, New York : 213-315.

Mellerowicz, E. et M. Bonnet-Masimbert, 1983. *Pollen de douglas, mélèzes, aulnes et peupliers. Bilan des recherches conduites en 1982-1983*. Doc. stat. amél. arbres forestiers. INRA, Orléans, 6/83, 51 p. + 66 p., tabl. et fig.

Mellerowicz, E. et M. Bonnet-Masimbert, 1986. *Importance de la teneur en eau du pollen pour la réalisation de croisements contrôlés chez le douglas*. Ann. Sci. For. 43(2) : 179-188.

Mercier, S., 1990. *Conservation et test de viabilité du pollen en vue de l'établissement d'une banque*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, Direction de la recherche. Rapport interne n° 323. 35 p.

Mercier, S., 1995. *The role of a pollen bank in the tree genetic improvement program in Québec (Canada)*. Grana 34 : 367-370.

Mercier, S., 1996. *Mécanismes de reproduction sexuée des conifères et utilisation de ces connaissances dans la production de graines améliorées. I.* L'Aubelle 112 (36) : 1-12.

Mercier, S. et A. Stipanicic, 1990. *Réceptivité des cônes femelles, maturation et techniques de forçage des cônes mâles de quelques essences résineuses en relation avec la pollinisation dirigée*. Ministère de l'Énergie et des Ressources, Direction de la recherche. Rapport interne n° 324. 36 p.

Mercier, S. et D. Tousignant [2000]. *Glossaire de la reproduction sexuée des plantes terrestres*. (en cours de révision).

Mercier, S., T. Morissette et D. Blanchette, 1991. *Évaluation des cônes de pin gris en vue de la récolte de semences de qualité*. Ministère des Forêts, Direction de la recherche. Mémoire de recherche forestière n° 101. 42 p.

Mercier, S. et S. Paiva, 1994. *Description des différentes stratégies de vergers à graines à pollinisation dirigée destinés à la deuxième génération de croisements*. Ministère des Ressources naturelles, Direction de la recherche forestière. Rapport interne n° 380. 39 p.

MERCIER, S., A. RAINVILLE et G.-É. CARON, 1994. *Contamination pollinique potentielle dans quatre vergers à graines au Québec*. Ministère des Ressources naturelles, Direction de la recherche forestière, Mémoire de recherche forestière n° 113. 78 p.

MISHRA, R. et K.R. SHIVANNA, 1982. *Efficacy of organic solvents for storing pollen grains of some leguminous taxa*. Euphytica 31(1): 991-995.

MOODY, W.R. et J.B. JETT, 1990. *Effects of pollen viability and vigor on seed production of loblolly pine*. South. J. Applied For. 14(1) : 33-38.

MULCAHY, G.B., D.L. MULCAHY et P.L. PFAHLER, 1982. *The effect of delayed pollination in* Petunia hybrida. Acta Bot. Neerl. 31 : 97-103.

MUREN, R.C., T.M. CHING et K.K. CHING, 1971. *Metabolic study of Douglas-fir pollen germinaion* in vitro. Physiol. Plant 46 : 287-292.

NYGAARD, P., 1977. *Utilization of exogenous carbohydrates for tube growth and starch synthesis in pine pollen suspension cultures*. Physiol. Plant. 39 : 206-210.

O'KELLEY, J.C., 1955. *External carbohydrases in growth and respiration of pollen tube* in vitro. Amer. J. Bot. 44 : 239-244.

OLESEN, J.M. et E. WARNCKE, 1989. *Temporal changes in pollen flow and neighbour hood tructure in a population of* Saxifraga hirculus *L.* Oecologia 79(2) : 205-211.

OKI, O., 1990. *Between-tree and floral relations in pollen viability and pollen tube growh in* Obeche (Triplochiton scleroxylon). For. Ecol. Manage. 37 : 259-265.

OTTEMANO, E. et D.L. MULCAHY, 1989. *Genetics of angiosperm pollen*. Dans : J.G. Scandalios (éd.). Advances in genetics, Vol. 26. Academic Press, New-York : 1-64.

OWCZARZAK, A., 1952. *A rapid method tr mounting pollen grains*. Stain Technol. 27(5) 249-251.

OWENS, J.N. et M. MOLDER, 1979. *Sexualreproduction of* Larix occidentalis. Can. J. Bot. 57 2673-2690.

OWENS, J.N. et M.D. BLAKE, 1985. *Forst tree seed production*. Canadian Forestry Servis, Petawawa National Forestry Institute. Information Report PI-X-53. 161 p.

PALFI, G. et S. GULYAS, 1985. *Rapid determination of pollen fertility of two insect pollinated plant species by staining with the aid of proline-isatine reaction*. Acta Biol. (Szeged) 31 : 49-53.

PFAHLER, P.L., 1968. In vitro *germination and pollen tube growth of maize* (Zea mays) *pollen. II. Pollen source, calcium and boron interactions*. Can. J. Bot. 46 : 235-240.

PFAHLER, P.L., 1973. In vitro *germination and pollen tube growth of Maize (*Zea mays *L.) pollen. VII : Effects of ultraviolet irradiation*. Rad. Bot. 13(1) : 13-18.

PFEIFFER, N.E., 1955. *Effect of lyophilization on the viability of* Lilium *pollen*. Contr. Boyce Thompson Inst. 18 : 153-158.

PHILIPPE, G., P BALDET, M. CAZET et A. VALADON, 1991. *Accélération de la production de matériel « mélèze hybride » (1re tranche)*. CEMAGREF, Rapport d'activité. 31 p.

PICTON, J.M. et M.W. STEER, 1982. *A model for the mechanism of tip extension in pollen tubes*. J. Theor. Biol. 98 : 15-20.

PICTON, J.M. et M.W. STEER, 1983. *Evidence for the role of Ca^{2+} ions in tip extension in pollen tubes*. Protoplasma 115 : 11-17.

PILBEAM, D.J. et E.A. KIRKBY, 1983. *The physiological role of boron in plants*. J. Plant Nutrition 6 : 563-582.

PIMIENTA, E. et V.S. POLITO, 1990. *Olive pollen storage and in vitro germination*. Act. Hort. 286 : 207-210.

POLITO, V.S. et J.G. LUZA, 1988. *Longevity of pistachio pollen determined by* in vitro *germination*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(2) : 214-217.

POHL, A., 1958. *Le pollen*. Presses universitaires de France, Paris. 125 p.

POWELL, G.R., 1989. *What is there to monitor, and when and where ? An overview of cone development of spruce, larch and pine*. Comptes rendus de la 22e conférence du C.T.I.A., Edmonton, 14 au 18 août : 63.

PROULX, J., 1994. *La conservation de la biodiversité : les suites du sommet de Rio*. Quatre-Temps 18(3) : 51-53.

Rainville, A. et Y. Lamontagne, 1991. *Un avenir prometteur - les vergers à graines... Dix années de réalisation*. Au fil du bois 17(2) : 7-10.

Rajora, O.P. et L. Zsuffa, 1985. *Pollen viability of some* Populus *species as indicated by* in vitro *germination and tetrazolium chloride staining*. Can. J. Bot. 64 : 1086-1088.

Rehfeldt, G.E., A.R. Stage et R.T. Bigham, 1971. *Strobili development in western white pine : periodicity, prediction, and association with weather*. For. Sci. 17 : 454-461.

Righter, F.I., 1939. *A simple method of making germination tests of pine pollen*. J. For. 37 : 574-576.

Sahar, N. et P. Spiegel-Roy, 1984. In vitro *germination of avocado pollen*. HortScience 19(6) : 886-888.

Sareen, T.S. et S. Vasisht, 1983. *Effect of sucrose concentration on* in vitro *germination of fresh and stored pollen in two arboreal species*. Ind. J. For. 6(2) : 120-124.

Sarvas, R., 1962. *Investigations on the flowering and seed crop of* Pinus sylvestris. Inst. For. Fenn. 53 : 1-198.

Schoenike, R.E. et C.F. Bey, 1981. *Conserving genes through pollen storage*. Dans : E.C. Franklin (éd.). *Pollen management handbook*. USDA Forest Service, Washington : 72-73.

Sedra, A. et G. Rajeev, 1982. *Effect of light spectra on pollen germination and pollen tube growth in* Cicer arietinum *cv BG 209*. Acta Bot. Indica 10 : 311-312.

Shellhorn, S.J., H.M. Hull et P.S. Martin, 1964. *Detection of fresh and fossil pollen with fluorochromes*. Nature 202 : 315-316.

Sheriff, A.M. et P.S. Muir, 1998. In vitro *effect of formaldehyde on Douglas fir pollen*. Plant, Cell and Environment 21 : 341-348.

Shivanna, K.R. et J. Heslop-Harrison, 1981. *Membrane state and pollen viability*. Ann. Bot. 47 : 759-770.

Shivanna, K.R. et B.M. John, 1985. *The angiosperm pollen. Structure and function*. Wiley Eastern Ltd. 272 p.

Shivanna, K.R. et M. Cresti, 1989. *Effects of high humidity and temperature stress on pollen membrane untegrity and pollen vigour in* Nicotiana tabacum. Sex. Plant Reprod. 2 : 137-141.

Shivanna, K.R., H.F. Linskens et M. Cresti, 1991. *Pollen viability and pollen vigor*. Theor. Appl. Genet. 81 : 38-42.

Sidhu, R.J.K. et C.P. Malik, 1985. *Metabolic role of boron in germinating pollen an growing pollen tubes*. Biotechnol. & Ecol. Pollen, Proc. Internat. Conf. Biotechnol. & Ecol., July 9-11, Amherst, N.H. : 373-378.

Sowa, S. et K. Connor, 1995. *Biochemical changes during pollen germination measured in vivo by infrared spectroscopy*. Plant Science 105 : 23-30.

Smith, F.E., 1951. *Tetrazolium salt*. Science (Washington) 113 : 751-754.

Snyder, E.B. et K.E. Clausen, 1974. *Pollen handling*. Dans : Seeds of woody plants in the United States. Agric. Handbook No. 450, Chap. IV : 75-97.

Sorensson, C.T. et D.T. Nagahara, 1989. In vitro *pollen germination of* Leucaena *species*. Leucaena Research Reports 10 : 84-86.

Sorensson, C.T., J.H. Wright, E. Park et R.R. Rosecrance, 1989. *Autofluorescence of* Leucaena *pollen in ultraviolet light*. Leucaena Research Reports 10 : 87-89.

Stanley, R.G., 1971. *Pollen chemistry and tube growth*. Dans : Pollen : J. Heslop-Harrison (éd.). Development and Physiology. Appleton Century Crofts, New York : 131-155.

Stanley, R.G. et I. Pogosyan, 1981. *Endogenous carbohydrates, organic acids and pine pollen viability*. Silvae Genet. 11(1) : 1-3.

Stanley, R.G. et H.F. Linskens, 1974. *Pollen : biology, biochemistry, and management*. Springer-Verlag, New York. 307 p.

Subbaiah, C.C., 1984. *A polyethylene glycol based medium for in vitro germination of cashew pollen*. Can. J. Bot. 62 : 2473-2475.

Sweet, G.B., 1973. *Shedding of reproductive structures in forest trees*. Dans : T.T. Kozlowski, éd. Shedding of plant parts. Academic Press, New York : 341-382.

TAKAO, A., 1960. *Histochemical studies on embryogenesis of* Pinus thunbergii. Parl. Bot. Mag. Tokyo 73 : 379-388.

TOWILL, L.E., 1985. *Low temperature and freeze-vacuum drying preservation of pollen*. Dans : K.K. Katho (éd.). Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc., Baco Raton : 171-198.

TOWILL, L.E., 1991. *Cryopreservation*. Dans : J.H. Dodds (éd.). *In vitro* methods for conservation of plant genetic resources. Chapman and Hall, Londres : 41-70

VAN RYN, D.M., J.S. JACOBSEN et J.-P. LASSOIE, 1986. *Effects of acidity on* in vitro *pollen germination and tube elongation in four hardwood species*. Can J. For. Res. 16 : 397-400.

VASIL, I.K., 1987. *Physiology and culture of pollen*. Internat. Rev. Cytol. 107 : 127-174.

VERLEUR, L., D. ST-ARNEAULT, S. MERCIER et G. LAMBANY, 1992. *Technique d'analyse des composés physiologiques employées dans la Division de R-D sur les semences, boutures et plants*. Ministère des Forêts, Direction de la recherche. Guide [interne] d'utilisation. 90 p.

VERDEIL, J.-L. et C. PANNETIER, 1990. *Optimisation des conditions de germination* in vitro *du pollen de cocotier (Cocos nucifera L.) pour la mise au point d'un test de viabilité*. Oléagineux 45(4) : 175-181.

VERGANO, G., L. RADICAN et I. MARTINO, 1990. *Investigations on viability and germinability of English walnut pollen*. Act. Hort. 284 : 285-293.

VISSER, T., 1955. *Germination and storage of pollen*. Meded. Landbouwhogesch., Wageningen 55 : 1-68.

WANG, B.S.P., 1975. *Tree seed and pollen storage of genetic conservation possibilities and limitations*. Dans : *The methodology of conservation of forest genetic resources*. Petawawa National Forestry Institute, FO:MISC-75-8 : 93-103.

WEBBER, J.-E., 1987. *Increasing seed yield and genetic efficiency in Douglas-fir seed orchards through pollen management*. For. Ecol. Manag. 19 : 209-218.

WEBBER, J.-E. et M. BONNET-MASIMBERT, 1989. *Influence of the moisture content of forest tree pollen on its response to different viability tests*. Ann. Sci. For. 46 (suppl.) : 60-63.

WEBBER, J.-E. et M. BONNET-MASIMBERT, 1993. *The response of dehydrated Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) pollen to three* in vitro *viability assays and their relationship to actual fertility*. Ann. Sci. For. 50 : 1-22.

WEBBER, J.E. et S.D. ROSS, 1995. *Flower induction and pollen viability for western larch*. Dans : W.C. Schmidt et K.J. McDonald, éd. Proc. IUFRO Symp. on the ecology and management of Larix Forests. USDA Forest Service, Whitefish, MT, USA : 395-402.

WEBBER, J.E., 1995. *Pollen management for intensive seed orchard production*. Tree Physiology 15 : 507-514.

WEBBER, J.E., 1996. *Douglas-fir pollen management manual*. 2e édition. B. C. Ministry of Forests, Victoria, Work Paper 02/1996. 91 p.

WON LEE, C., J.C. THOMAS et S.L. BUCHMANN, 1985. *Factors affecting* in vitro *germination and storage of jojoba pollen*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110(5) : 671-676.

WORSLEY, R.G.F., 1959. *The processing of pollen*. Silvae Genet. 8 : 143-148.

Annexe I

Informations utiles pour acquérir les principales pièces d'équipement nécessaires aux différentes étapes de conservation et d'évaluation de la viabilité du pollen

Matériel	Compagnie	N° de catalogue	Prix*
Flacon de type pénicilline de 10 ml	VWR Canlab 8567, chemin Dalton Montréal (Québec) H4T 1V5 Tél. : 1.800.932.5000 (514) 344.35.25 Fax : 1.800.668.6348	26675-920	102,55 $ CAN (pour 200 flacons)
Bouchon en caoutchouc de forme étoilée (conservation à long terme)	OSI B.P. 124 78312 Maurepas Cedex France Tél. : 0.11.33.1.30.13.24.40 Fax : 0.11.33.1.30.66.00.25	A75-080-142	48,00 FRF (pour 100 bouchons)
Tissu en nylon monofilament *Blutex 180* (largeur 124 cm)	Tripette et Renaud 20, avenue Marcellin-Berthelot 92396 Villeneuve-la-Garenne Cedex France Tél. : 0.11.33.1.47.94.40.21 Fax : 0.11.33.1.47.98.29.04	606938	380,90 FRF (pour 1 mètre)

Annexe II

Vade mecum de la gestion de la banque de pollen du ministère des Ressources naturelles du Québec

1. Récolte des cônes mâles et extraction du pollen

1.1 Récolte des cônes mâles

— Récolte à maturité, juste avant la déhiscence des sacs polliniques.

— Déposer les cônes dans des sacs en papier *Kraft* sur lesquels le nom de l'essence, le numéro de clone, la date ainsi que le lieu de récolte sont clairement inscrits.

— Placer les sacs dans une glacière à l'abri de l'humidité pour la durée de la récolte.

— Remplir une fiche d'entrée de la Banque informatisée de pollen (BIP), noter les informations concernant le nom du client (responsable du projet), l'espèce et les clones récoltés, la date et le lieu de récolte.

1.2 Séchage des cônes mâles

Le séchage doit être appliqué le plus rapidement possible afin de limiter l'action de l'humidité encore présente dans les cônes. Deux cas sont possibles.

1.2.1 Séchage au laboratoire des semences
(Service de la génétique, de la reproduction et de l'écologie)

— Placer les cônes mâles dans des tamis en plastique de 10 cm de haut, dont le fond est constitué d'une toile à mailles soudées de 35 µm. La couche de cônes ne doit pas dépasser 2 cm. Répartir les cônes dans autant de tamis que nécessaire pour assurer un bon séchage. Dans le cas où plusieurs tamis sont nécessaires, bien reproduire toutes les informations inscrites sur le sac d'origine.

— Recouvrir le tamis avec un papier mouchoir pour éviter la contamination entre les échantillons. Placer dans un four à convection réglé à 30 °C durant 16 heures.

1.2.2 Séchage sur le lieu de la récolte

— Mettre les cônes à sécher dans les mêmes sacs que ceux qui ont servi à la récolte. Les sacs de récolte sont coupés afin de ne laisser qu'une hauteur de papier de 6 cm environ. La procédure à suivre est la même que pour les tamis.

1.3 Extraction du pollen

— Déposer les cônes mâles secs dans un tamis dont le diamètre des mailles correspond à l'essence à extraire.

— Secouer les cônes de façon à faire sortir tout le pollen contenu dans les sacs polliniques ; ne pas écraser les fleurs. Si la récolte a été faite juste avant la déhiscence des sacs polliniques, le pollen sera très facilement extrait et les rendements d'extraction seront élevés. Dans le cas où la récolte a eu lieu trop tôt, les sacs polliniques seront encore humides, le pollen sera extrait avec difficulté et sera humide, ce qui nuit grandement à sa viabilité.

— Répartir le pollen extrait dans des bouteilles en verre de type pénicilline de 10 ml remplies aux trois quarts (7 ml).

— Fermer avec un bouchon de caoutchouc qui sera percé par une aiguille de seringue de façon à permettre le dégagement des gaz émis lors de la conservation. Les aiguilles seront retirées après 7 jours.

— Identifier les bouteilles pour les faire correspondre aux données contenues dans la fiche de la BIP.

— Placer les bouteilles dans un dessiccateur contenant de la *Drierite*. Appliquer le vide et mettre au réfrigérateur.

— Nettoyer soigneusement la surface de travail ainsi que les tamis et les outils utilisés après chaque extraction. Les échantillons ainsi préparés pourront être conservés un mois sans aucun traitement supplémentaire.

1.4 Cas d'une récolte effectuée sur un site éloigné

Lorsque la récolte a lieu sur un site où l'extraction du pollen ne peut avoir lieu rapidement (cas des vergers à graines éloignés), il est recommandé d'appliquer le séchage puis de replacer les échantillons au froid dans des dessiccateurs contenant de la *Drierite*. S'il est même difficile de trouver un four pour faire sécher le pollen, voici une façon originale de faire sécher les cônes mâles :

— faire chauffer une pièce à 30 °C ;

— assurer une bonne circulation de l'air à l'aide de ventilateurs ;

— déposer les sacs de cônes sur des supports grillagés afin d'améliorer la circulation de l'air.

2. Évaluation de la viabilité des échantillons de pollen

Si des échantillons doivent être utilisés rapidement, le test de germination *in vitro* sera réalisé sur le pollen extrait sans aucun traitement supplémentaire. Dans le cas d'échantillons devant être conservés à long terme dans la banque, le test de germination ne sera réalisé qu'après le deuxième séchage du pollen.

2.1 Deuxième séchage du pollen

— Placer les échantillons de pollen, au maximum 21 ml, dans des petits tamis en *PVC* dont le fond est constitué d'une toile fine à mailles soudées. Identifier et recouvrir d'un papier mouchoir. Préparer autant de tamis que la quantité de pollen l'exige.

— Déposer dans un four à convection réglé à 40 °C pendant 4 heures.

— Regrouper tous les tamis correspondant à un même échantillon ; bien homogénéiser.

— Prélever un échantillon pour la réalisation du test de germination *in vitro*.

— Identifier les bouteilles, noter les volumes de pollen et inscrire ces informations sur la fiche de données de la BIP.

— Les bouteles sont replacées dans les dessiccateurs, sous vide, en attendant la lyophilisation. Il est inutile de percer le bouchon avec des aiguilles de seringue.

2.2 Test de germination *in vitro*

— Préparation du milieu de culture, stérilisation et répartition dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre (test de germination en milieu solide). Les boîtes de milieu de culture se conservent un mois au réfrigérateur. Pour les tests de germination en milieu liquide (cas du mélèze), le milieu de culture, stérile, est utilisé dès son refroidissement.

2.2.1 *Milieu liquide*

— Déposer quelques gouttes de milieu de culture dans des puits de type ELISA, déposer le pollen en surface. Retourner le puits et le déposer sur une grille, stérile, dans une boîte de Pétri, stérile, cela va permettre la circulation de l'air. Sceller la boîte avec du *Parafilm*, la placer dans un plat de germination noir dans la chambre de culture à 25 °C pour la durée de la culture.

— Homogénéiser le contenu du puits, prélever un échantillon, le déposer entre lame et lamelle et déterminer le nombre de grains de pollen considérés comme germés par rapport au total.

— Reporter le résultat moyen obtenu sur la fiche de données de la BIP.

2.2.2 *Milieu solide*

— Déposer une faible quantité de pollen à la surface du milieu de culture. Recouvrir toute la surface du milieu sans faire d'agrégats.

— Sceller la boîte de Pétri avec du *Parafilm*. Placer les boîtes à l'envers dans un plat de germination noir dans une chambre de culture à 25 °C pour la durée de la germination (de 1 à 3 jours).

— Déterminer le nombre de grains de pollen germés par rapport au total par observation au microscope. Reporter le résultat moyen de germination sur la fiche de données de la BIP.

3. Conservation à long terme dans la banque de pollen

La technique retenue pour conserver des échantillons à long terme est l'entreposage au froid à -30 °C après la lyophilisation.

— Changer les bouchons en caoutchouc percés pour des bouchons qui se vissent, ne pas fermer hermétiquement.

— Tremper les bouteilles aux trois quarts dans de l'azote liquide (-196 °C) pendant 2 minutes environ jusqu'à ce que l'ébullition cesse.

— Remplacer les bouchons qui vissent par des bouchons étoilés en caoutchouc ; ne pas fermer complètement les bouteilles.

— Disposer les bouteilles dans un lyophilisateur, dont la température a préalablement été portée à -40 °C.

— La lyophilisation a lieu à -65 °C durant 15 minutes à partir du moment où la pression dans le lyophilisateur atteint 10 mm de Hg.

— Sortir les bouteilles scellées du lyophilisateur et visser les bouchons sur les bouteilles.

— Attribuer un numéro pour le classement dans la banque de pollen, le reporter sur les étiquettes de la bouteille et des bouchons pour toutes les bouteilles d'un même clone.

— Ranger les bouteilles dans les tiroirs de la banque de pollen au congélateur. Reporter dans la BIP la localisation des différents clones dans les tiroirs de la banque. La figure 24 montre la répartition des bouteilles dans un tiroir de la banque de pollen.

4. Utilisation des échantillons de pollen conservés dans la banque

— Remplir une demande de prélèvement dans la BIP au moins deux jours avant d'utiliser le pollen (figure 25).

— Sortir les échantillons de la banque, les placer dans un dessiccateur au réfrigérateur pendant 24 heures.

— Prélever un échantillon de pollen pour la réalisation d'un test de germination *in vitro* (bien homogénéiser le contenu de la bouteille avant de faire le prélèvement). Si la demande concerne plusieurs bouteilles d'un même clone, le contenu de toutes les bouteilles devra être mélangé avant le prélèvement. Le pollen pourra alors être utilisé.

— Réaliser le test de germination décrit en 3.2.

— Réactualiser les données de la BIP (nouveau volume de pollen, nouveau pourcentage de germination *in vitro*).

Banque informatisée de Pollen

MRN. Service Génétique, Reproduction et Écologie
2700, rue Einstein
Sainte-Foy (Québec) G1P 3W8
Tél : (418) 643-7994
Télec : (418) 643-2165

N° P	Client	Espèce	N° de lot (clone)	Récolte		Volume (ml)	Nb bouteilles	Test de germination			Date de lyophilisation	Emplacement		Remarques
				Lieu	Date			Date	% germ.	Champ.		Tiroir	Case ini.	

Feuille entrée de pollen 2000-01-20 09:16 Fabienne Colas, biol., DESS
Stéphan Mercier, ing.f., M.Sc.

Figure 23. Feuille à remplir lors de la récolte de lots de pollen devant être entreposés dans la banque.

91	1313	1313	1313	1314	1314	1314		1315	1315	1315
81	1312	1312	1312	1312	1312	1312	1312	1312		1313
71	1312	1312	1312	1312	1312	1312	1312	1312	1312	1312
61	1310	1310		1311	1311	1311	1311	1311	1311	1311
51	1297		1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310
41	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297
31	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297	1297
21		1296	1296	1296		1297	1297	1297	1297	1297
11	1295	1295	1295	1295	1295	1295	1295	1295	1295	1295
1	1294	1294	1294	1294	1294	1294	1294	1294	1295	1295

Figure 24. Exemple de fiche présentant la répartition des bouteilles de pollen dans le tiroir 27 de la banque de pollen. Les chiffres dans les cases représentent les numéros P qui sont associés aux clones présents dans la banque. Les nombres à gauche de chaque rangée permettent de localiser les bouteilles dans le tiroir.

Banque informatisée de Pollen

MRN. Service Génétique, Reproduction et Écologie
2700, rue Einstein
Sainte-Foy (Québec) G1P 3W8
Tél : (418) 643-7994
Télec : (418) 643-2165

N° P	Client	Espèce	N° de lot (clone)	Prélèvement souhaité			Emplacement	
				N. de flacons	Volume (ml)	Date	Tiroir	Case initiale

Feuille de prélèvement

2000-01-20 08:16

Fabienne Colas, biol., DESS
Stéphan Mercier, ing.f., M.Sc.

Figure 25. Feuille à remplir lors d'une demande de prélèvement de lots de pollen entreposés dans la banque.

Un des mandats de Forêt Québec est de fournir gratuitement des plants pour le reboisement de la forêt publique et privée. Le Programme d'amélioration génétique a pour but de sélectionner les meilleurs arbres qui donneront des graines de qualité supérieure avec des gains génétiques maximum. Ces graines serviront à la production de plants destinés au reboisement. Les travaux de recherche sur l'évaluation et le maintien de la viabilité des pollens des arbres forestiers vont permettre de disposer, en tout temps et en tout lieu, de pollen de qualité afin de réaliser les croisements qui permettront d'atteindre le gain génétique potentiel déterminé par les améliorateurs, et de maximiser le rendement de la production de graines améliorées.

Québec

Ministère des
Ressources naturelles

ISBN 2-550-35041-3
F.D.C. 283(047.3)(714)
L.C. SD 401.6

2000-3041